

Nantes

N°

1

THÈSE

présentée à la

FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE

d'ANGERS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR en PHARMACIE

Diplôme d'Etat

par

Jean-Marcel SENET

Pharmacien

HEMAGGLUTINATION PASSIVE IMPLIQUANT LE GLUTARALDÉHYDE

APPLICATION AU DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES

soutenue le 19 décembre 1969

JURY

Président :

M. le Professeur GERMAN

Examineurs

M. le Professeur DESJOBERT

M. le Professeur VARGUES

Page 44 : entre la 3ème et la 4ème ligne, rajouter :
+ 1ml de la solution antigénique
- homogénéisation

Page 106 :
ligne 32 : au lieu de "la moyenne étant de 25"
lire "la moyenne étant de 8"

Page 111 :
ligne 9 : au lieu de "résorber"
lire "désorber".

NIVERSITÉ de NANTES

ANNÉE 1969

FACULTÉ de MÉDECINE

et de PHARMACIE

d'ANGERS

N^o

THÈSE

présentée à la

FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE

d'ANGERS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR en PHARMACIE

Diplôme d'État

par

Jean-Marcel SENET

Pharmacien

HEMAGGLUTINATION PASSIVE IMPLIQUANT LE GLUTARALDEHYDE

APPLICATION AU DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES

soutenue le 19 décembre 1969

JURY

Président :

M. le Professeur GERMAN

Examineurs

M. le Professeur DESJOBERT

M. le Professeur VARGUES

FACULTE MIXTE
DE MEDECINE ET DE PHARMACIE D'ANGERS

Doyen Honoraire : Professeur ROUCHY
Professeurs Honoraires : MM. DAVID, ROUSSEAU, AMSLER.

Le Président du Conseil Transitoire :

Mr. J.C. RENIER

Assesseur :

Mr. H. GERMAIN

I. - PROFESSEURS. -

a) - Professeurs Titulaires

MM.	COTTIN	Chimie Générale
	DELAITRE	Clinique Médicale Infantile
	DESJOBERT	Pharmacie Chimique et Toxicologie
	FRESSINAUD	Clinique Médicale B
	GERMAIN	Botanique et Cryptogamie
	GOYER	Clinique Chirurgicale B
	GUERIN	Biophysique Médicale
	GUNTZ	Anatomie
	HERISSET	Matière Médicale
	HERMANN	Clinique Ophtalmologique
	JOLIVET	Chimie Analytique
	LAFARGUE	Pharmacie Galénique
	MARTIN	Pathologie Chirurgicale
	MENARD	Hygiène et Médecine Sociale
	NAULLEAU	Clinique Chirurgicale A
	OURY	Clinique Pneumo-Phtisiologique
	PERREAU	Clinique Médicale A
	RENIER	Clinique Rhumatologique
	ROUCHY	Clinique Obstétricale et Gynécologie
	SIMARD	Anatomie Pathologique



II - PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	HOCQUET	Parasitologie (M.C.A.)
	PARSY	O. R. L.
	PERTUS	Urologie
	ROGNON	Chirurgie Générale

III - AGREGES

	GODLEWSKI	Neurologie et Psychiatrie
	TESTARD	Pédiatrie
	THUAU	Pathologie Médicale

IV - MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM.	AUGEREAU	Pharmacodynamie
	BAILLY	Physique
Mme	CAVELLAT	Anesthésiologie
MM.	CARON	Electroradiologie
	COULLAUD	Physiologie
	FRESNEAU	Médecine Générale et Thérapeutique
	HY	Dermatologie
	JOUBAUD	Médecine Générale et Expérimentale
	PILLET	Anatomie
	PILLOT	Bactériologie
	PLANE	Chirurgie Générale
Mlle	PRELOT	Zoologie
M.	TADEI	Thérapeutique

Secrétaire de la Faculté Mr. R. MAILLEUX

Conservateur de la Bibliothèque

de l'Université Mme GALKOWSKI

A ma Femme

qui m'a aidé et encouragé pour la réalisation de cette thèse,
en témoignage de mon amour.

A mes Enfants

A ma Mère

qui, par son amour et son dévouement de tous les instants,
m'a soutenu tout au long de mes années d'études.

A mon Père

en témoignage de mon admiration.

A mon Grand Père

qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde affection.

A ma Soeur.

A mes Frères.

A mes Beaux-Parents.

A toute ma famille.

A notre Président de thèse :

Monsieur le Professeur GERMAN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de PARIS,

Pharmacien des Hôpitaux,

Membre de l'Académie de Pharmacie.

qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.

Qu'il soit assuré de notre respec-
tueuse admiration et de notre re-
connaissance pour la bienveillance
dont il fait preuve à notre égard.

A Monsieur le Professeur DESJOBERT

Professeur de Pharmacie Chimique et Toxicologie.

Nous le remercions d'avoir accepté d'être
notre juge, qu'il trouve ici le témoignage
de notre respect et de notre gratitude.

A Monsieur le Professeur VARGUES

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine
de TOURS.

Nous savons l'intérêt qu'il porte à la
recherche scientifique. Sa présence ici
est pour nous un encouragement et un grand
honneur.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer
notre admiration et notre gratitude.

A notre Maître

Monsieur le Professeur PILLOT

Docteur ès Sciences

Maître de Conférences Agrégé

Biologiste des Hôpitaux.

Il nous a donné notre orientation. Nous avons bénéficié de ses conseils, de sa compétence et de sa rigueur scientifique.

Nous le remercions de tout ce qu'il a bien voulu faire pour nous et le prions d'accepter l'assurance de notre respect et de notre gratitude.

A Monsieur le Professeur FRESSINAUD-MASDEFEIX

Professeur de Clinique Médicale
Médecin des Hôpitaux.

Il nous a fait l'honneur de bien vouloir nous accueillir dans son laboratoire où une grande partie de ce travail a été effectuée.

Puisse-t-il accepter l'assurance de notre très respectueuse admiration.

A Monsieur le Professeur GUERIN

Professeur de Biophysique Médicale.

Il a grandement facilité notre tâche en mettant à notre disposition son laboratoire de radioisotopie.

Qu'il trouve ici l'expression de nos vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur HOCQUET

Professeur de Parasitologie

Nous avons eu la chance de pouvoir bénéficier de sa grande bonté.

Qu'il soit assuré de notre admiration et de notre reconnaissance pour la sympathie dont il fait preuve à notre égard.

A nos Amis :

Mademoiselle L. GRANGEOT

Monsieur C. GAILLIOT

Monsieur JALLET

Monsieur LAJET

Leur collaboration nous fut précieuse.

A Madame LAURENT,

dont la compétence technique et le dévouement sans réserve nous ont permis de réaliser ce travail.

Qu'elle trouve ici, le témoignage de notre reconnaissance et de notre sincère amitié.

A tout le personnel du Laboratoire dont l'esprit d'équipe a facilité notre tâche.

I N T R O D U C T I O N

Notre but primitif était d'utiliser une technique suffisamment sensible, se prêtant à l'étude de la structure des Immunoglobulines myélomateuses.

L'inhibition de l'héماغglutination semblait permettre une étude relativement fine de ces structures, compte-tenu de la possibilité qu'elle offre de doser des fragments protéiques ne possédant qu'un déterminant antigénique. C'est en voulant adopter ces techniques d'héماغglutination que nous nous sommes peu à peu aperçu de l'intérêt qu'elles présentent en elles-mêmes. Nous avons préalablement fixé notre choix sur les globules rouges formolés en tant que particule support, leur bonne conservation et leur facilité de préparation leur conférant un intérêt particulier.

Parmi les nombreux agents de copulation utilisés pour fixer des protéines à la surface des globules rouges, trois nous semblaient particulièrement intéressants : la Benzidine-bis-diazotée, le Chlorure de Chrome et le Glutaraldéhyde.

Nous expliquerons les raisons qui nous ont amené, après une étude comparative des trois techniques, à approfondir plus particulièrement la technique utilisant le glutaraldéhyde.

HISTORIQUE

L'agglutination passive consiste à fixer un antigène sur une particule support. La particule ainsi sensibilisée acquiert une spécificité antigénique nouvelle. Elle est alors capable d'être agglutinée par l'anticorps correspondant.

L'intérêt de cette technique réside principalement dans la grande sensibilité qu'elle présente. En effet, la particule support ayant un volume et une masse considérable par rapport à l'antigène fixé l'agglutination sera visible, pour des concentrations d'anticorps très faibles.

Le dosage des antigènes peut être effectué en utilisant l'inhibition de l'hémagglutination, cette deuxième technique se greffe sur la première, elle présente de même une très grande sensibilité.

Les problèmes posés par l'agglutination passive sont multiples. Il faut tout d'abord, un support relativement neutre et stable permettant une fixation aisée de l'antigène. L'ensemble formé doit lui-même présenter une stabilité suffisante.

Plusieurs étapes peuvent être artificiellement dénombrées, selon que l'on fixe l'antigène directement par simple adsorption, que l'on utilise une fixation immunologique ou bien, et c'est la technique de beaucoup la plus répandue, que l'on utilise un agent de fixation permettant de réaliser une liaison entre la particule support et l'antigène.

Les particules supports peuvent être de différents types. Nous citerons par exemple les particules de collodion, de latex, de bentonite et de carmin. Mais en fait, les plus souvent utilisées sont les globules rouges et parmi eux plus particulièrement les globules rouges de mouton ou humains de type O Rh⁻. Dans ces derniers cas, l'agglutination est alors appelée hémagglutination.

En 1948, KOEGH montra que l'on pouvait fixer des polysides bactériens à la surface des globules rouges par simple contact à 37°. De tels globules devenaient agglutinables à l'aide d'anticorps antipolysidiques correspondants. Ces travaux repris par de nombreux auteurs montrent la nécessité de groupements ionisés ou d'acides gras (47) pour que la fixation ait lieu.

La même année, MIDDLEBROOK et DUBOS sensibilisent des globules rouges à l'aide d'extraits de bacilles tuberculeux (34). COOMBS, par contre, utilise un complexe immunologique, en fixant sur les globules rouges les anticorps de spécificité correspondante. Cette possibilité est évidemment limitée aux anticorps incomplets spécifiques des antigènes du globule rouge. Il utilise aussi la conjugaison d'un anti-

gène avec un anticorps incomplet anti-rhésus, ce dernier servant de lien avec le globule rouge (9).

Si les polyosides s'adsorbent assez facilement sur le globule rouge, il n'en est pas de même avec les protéines. Leur fixation nécessite un traitement particulier des globules rouges. Le premier procédé fut proposé par BOYDEN en 1951. Il consiste en un traitement des globules rouges par l'acide tannique (5). La fixation des protéines est alors possible, mais il semble que les forces de liaison soient faibles et certains auteurs ont observé la désorption de l'antigène lors du lavage des globules rouges ainsi sensibilisés.

Les autres procédés utilisent des agents de fixation établissant un pont entre l'antigène et le globule rouge.

PRESSMANN, CAMPBELL et PAULING dès 1942 préconisent pour la première fois l'utilisation de la Benzidine-bis-diazotée, cette substance réalise de véritable liaison covalentes entre le globule et l'antigène (39). Cette technique a été particulièrement mise au point par STAVISKY et ARQUILLA (45). Les difficultés résident surtout dans la préparation du réactif. De plus, la fixation par la Benzidine-bis-diazotée, intervient au niveau des résidus tyrosyls et histidyls qui furent longtemps soupçonnés d'avoir un rôle important dans la spécificité.

En 1961, LING propose le 1-3 difluoro 4-6, dinitrobenzène (D. F. D. N. B.) (26). En 1964, CYENES et SEHON proposent le Tolyène, 2-4 diisocyanate. En 1966, JOHNSON et AL proposent le Carbodiimide (22) (23).

L'utilisation de pont métallique fut proposée en 1957 par JANDL et SIMMONS, c'est le Cr +++ qui s'est avéré le meilleur agent de copulation (20) (18).

L'utilisation du glutaraldehyde comme agent de fixation est beaucoup plus récente, il faut citer les travaux d'AVRAMEAS (I) et d'ONKELINX (36) sur ce sujet.

Dans notre travail, nous comparons en premier lieu la technique de sensibilisation utilisant le glutaraldéhyde à celles utilisant la benzidine-bis-diazotée et le chlorure de chrome. Ces techniques sont relativement faciles à mettre en oeuvre et il est assez aisé de faire ou de se procurer les agents de fixation utilisés.

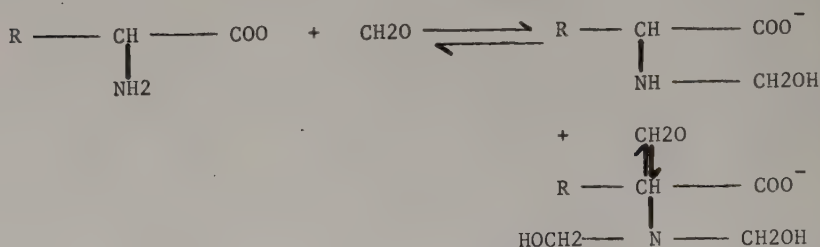
Dans une deuxième partie, et après avoir énoncé les raisons qui nous font préférer le glutaraldéhyde, nous étudions plus particulièrement les différents paramètres intervenant dans la technique utilisant cet agent de fixation. Puis, après un essai d'explication du phénomène de fixation des antigènes au niveau de la membrane du globule rouge, nous abordons l'aspect quantitatif de la méthode et la technique d'inhibition de l'hémagglutination. Pour conclure, nous envisageons l'utilité que peut présenter cette méthode pour doser certaines protéines antigéniques dans différents liquides biologiques.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

FORMALISATION DES HEMATIES

I - PRINCIPE.

Le formaldéhyde a la propriété de se fixer sur les radicaux N H₂ libre des acides aminés.



Il bloque ainsi certains systèmes enzymatiques du globe rouge, le transformant en une particule relativement stable et facile à conserver. Les techniques de formolisation sont relativement nombreuses (19, 31, 44, 10, 7, 51). Nous avons fixé notre choix sur la technique BUTLER en raison de la simplicité de sa méthode et de la reproductibilité de ses résultats.

II - REACTIFS.

A - Solution conservatrice d'ALSEVER.

glucose	82 g
citrate de Na	32 g
NaCl	16,8 g
E. D. qsp	4000 ml
pH	6,1

B - Solution mère de tampon phosphate 0,3 M pH 7,2

PO ₃ H ₂ K	10 g
PO ₃ HNa ₂ 12H ₂ O	80 g
E. D. qsp	1000 ml

C - Solution mère de ClNa 3M

ClNa	176 g
E. D. qsp	1000 ml

A diluer au 1/20ème pour avoir un soluté physiologique de ClNa.

Ces deux solutions mères ont une concentration de sels suffisamment élevée pour inhiber la multiplication de bactéries ou de champignons. Elles peuvent donc être préparées en grande quantité et conservées à la température du laboratoire.

D - Solution tampon pour lavage des hématies.

- 1 volume de B
- 1 volume d'eau distillée
- 2 volumes de C préalablement dilué au 1/20ème.

E - Solution de formaldéhyde à 40 %. ramené à 3 %, à l'aide du tampon D.

pH amené si besoin à 7,2.

F - Tampon phosphate 0,01MClNa 0,14^MpH 7,2 = tampon phosphate physiologique.

Réactif B	33,3 ml
Réactif C	46,5 ml
E. D. qsp	1000 ml

Conservation à + 4°

III - TECHNIQUES

1) Préparation de la suspension globulaire :

Les hématies sont prélevées directement à l'abattoir au moment du sacrifice par sectionnement de la carotide. Le sang est recueilli à partie égale dans une solution d'ALSEVER (réactif A).

La suspension est bien homogénéisée afin d'éviter la formation de caillot. Elle peut être conservée plusieurs jours à + 4°, mais il est préférable de séparer les globules rouges par centrifugation le plus rapidement possible.

Le culot globulaire est ensuite lavé cinq fois dans vingt volumes de tampon (réactif D). Le surnageant doit être parfaitement limpide sans aucune trace d'hémolyse.

Les globules rouges sont alors ramenés à 8 % (v/v) à l'aide du même tampon D.

2) Formolisation :

1 volume de globules rouges à 8 % en tampon D.

1 volume de formol à 3 % en tampon (réactif E).

Il est préférable d'opérer en versant les deux préparations dans un 3ème récipient afin de maintenir une concentration constante des deux réactifs.

Le mélange est ensuite placé à l'étuve à 37° pendant 18 H. avec une agitation continue. Celle-ci doit être douce, il ne doit en aucun cas y avoir production de mousse.

Les globules rouges sont alors lavés cinq fois dans 20 volumes de tampon F, puis ramenés à 10 % (v/v).

Le dernier surnageant de lavage ne doit contenir aucune trace de formol. On le recherchera en ajoutant à 1 ml du tampon de lavage, 1,5 ml d'acide sulfurique et quelques cristaux d'acide chromotrope ; la présence de formol se traduit par l'apparition d'une coloration rose violacée (44).

La suspension de globules rouges formolés à 10 % est additionnée de néomycine à 100 γ /ml pour éviter les contaminations.

Ainsi préparées, ces suspensions se conservent parfaitement à + 4°, plusieurs semaines et même plusieurs mois. Cependant il est préférable de les conditionner sous de petits volumes correspondants aux quantités que l'on veut utiliser.

Nous avons constaté qu'un grand volume dans lequel des échantillons sont prélevés journallement devient inutilisable au bout de trois semaines à un mois, alors qu'un flacon préparé à la même période mais demeuré intact donne des résultats identiques à ceux du début.

Il est possible de conserver ces globules formolés par congélation ou après lyophilisation. Nous n'avons pas étudié les problèmes posés par ces différentes formes de stockage.

METHODES D'IMMUNISATION

Parmi les nombreuses techniques d'immunisation proposées, nous avons opté pour le procédé de PORTER, décrit ci-après, utilisant une première série d'injections intradermiques de l'antigène en suspension dans l'adjuvant de FREUND, suivie de plusieurs injections de rappel administrées par voie intraveineuses avec l'antigène insolubilisé par l'alun de potassium.

REACTIFS :

- Adjuvant de FREUND (réf. 0638 68) Laboratoires DIFCO.
- Solution mère d'alun de potassium :

- alun de potassium	20 g
- eau distillée qsp	200 ml

Chauffer légèrement à une température inférieure à 50°. S'il se forme un léger précipité, il est possible de l'éliminer par filtration. Si le précipité est trop important, la solution doit être recommencée. Conservation à la température du Laboratoire.

- Bleu de Bromothymol :
 - Solution à 1 % dans l'alcool absolu.
 - Colorations obtenues en fonction de pH :

bleu	pH	>	8
vert	pH	=	7,8
jaune	pH	<	7

- Solution de soude normale.
- Antigènes : voir méthode de préparation et critères de pureté des antigènes.
 - Solution protéiques à 16 mg/ml et à 32 mg/ml
 - 40 mg d'antigènes par lapin.
 - Nous avons choisi le lapin comme animal d'immunisation.

Préparation des suspensions antigéniques :

1) - Avec l'adjuvant de FREUND :

un volume de la solution de l'antigène à 16 p.1000
un volume de l'adjuvant de FREUND
concentration finale en protéine : 8 mg/ml

2) - Avec l'alun de potassium :

Un volume de la solution d'antigène à 32 p.1000
une goutte de bleu de Bromothymol
un volume de la solution d'alun de potassium
ramenée à 2 % (solution mère diluée au 1/5).

L'alun est additionné goutte à goutte dans la solution d'antigène ; le pH est rétabli au fur et à mesure à l'aide de la soude normale. Cette manipulation peut être effectuée sans le bleu de Bromothymol en utilisant un pH mètre. La solution obtenue présente un précipité que l'on homogénéisera au moment de l'injection.

Technique et tableau chronologique des injections :

Jours		
1	8 mg en injection intradermique en 10 points, sous un volume de 1 ml	0,5 ml d'antigène à 16 mg/ml + 0,5 ml d'adjuvant de FREUND
7	idem	idem
44	8 mg en injection intra-veineuse sous un volume de 0,5 ml	0,25 ml d'antigène à 32 mg/ml 0,25 ml d'alun de potassium à 2 %
48	idem	idem
51	idem	idem
54	Saignée d'essai pour vérifier le titre an anticorps. Le lapin est mis à jeun 24 heures, puis saigné à la carotide.	

Technique d'injection :

1) - Injection intradermique :

Le lapin est rasé sur ses deux flancs, puis en pinçant la peau entre le pouce et l'index, l'injection est faite tangentiellement le plus près possible de la surface. La suspension injectée, dans ce cas 0,1 ml, doit distendre la peau, réalisant une boursoufflure muriforme de 4 à 6 mm

de diamètre. Ces injections sont faites à raison de 10 par lapin, soit 5 sur chaque flanc de l'animal.

2)- Injection intraveineuse :

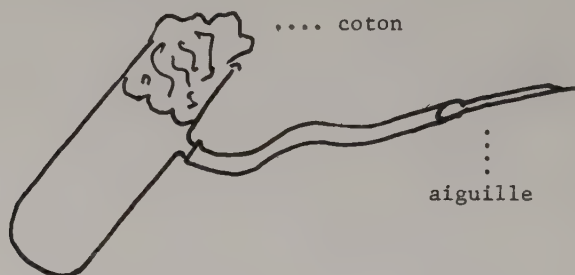
Le lapin est placé dans une boîte à contention immobilisant correctement l'animal, ne laissant apparaître que la tête et les oreilles.

L'injection est faite dans la veine marginale de l'oreille. Pour faciliter l'injection, il est préférable de pincer la veine en amont de façon à la faire gonfler en bloquant la circulation. L'injection est faite lentement.

Technique de saignée .

1) - Matériel :

- une table de contention
- tube de prélèvement : récipient de 200 à 300 ml, comportant une tubulure latérale sur laquelle est fixée un tube caoutchouc d'une cinquantaine de centimètres terminé par une aiguille de 40/20.



L'ensemble est stérilisé à l'autoclave.

- un matériel à dissection.

2) - Manipulation :

Le lapin est placé sur la table de contention sur sa face dorsale. La tête de l'animal est fixée à un anneau métallique par ses incisives de manière à bien libérer le cou. On dégage alors les carotides que l'on ponctionne. On laissera ainsi le sang recueilli, coaguler à la température du laboratoire. On peut activer la coagulation en plaçant le sang à 37°. Le caillot formé sera décollé des parois le plus aseptiquement possible. Le sérum est ensuite séparé par centrifugation puis stérilisé sur filtre millipore. Il est possible de le conserver au congélateur à - 25°.

FRACTIONNEMENT DES IMMUNOGLOBULINES G

I - PRINCIPE.

Précipitation des immunoglobulines G par l'éthanol à 18 % suivie d'un fractionnement sur colonne de DEAE cellulose.

II - MATERIEL.

- Colonne à chromatographie.
- Collecteur de fraction.
- Chambre froide ou enceinte réfrigérée.

III - REACTIFS.

- 1) Ethanol à 36 % (v/v)
- 2) Tampon phosphate 0,01 M, ClNa 0,14M pH 7,3 =
Tampon phosphate physiologique
- 3) Tampon phosphate 0,02 M, pH 7,3
- 4) Solution physiologique de ClNa
- 5) Butanol
- 6) DEAE cellulose régénérée.

Régénération de la DEAE cellulose :

On reprend 200 g de DEAE cellulose par 5 l de HCL N/10. Après homogénéisation, on filtre sur verre fritté et on lave par plusieurs litres d'eau distillée.

La galette obtenue est reprise par 5 l de Na OH N/10 homogénéisée comme plus haut et filtrée de même.

On lave ensuite par de l'eau distillée jusqu'à neutralité. La galette est alors reprise en tampon 0,02 M et additionnée de butanol à 1 % pour inhiber le développement de bactéries ou de champignons.

On laissera décanter la DEAE cellulose en enlevant périodiquement le surnageant trouble. Ce lavage en tampon phosphate 0,02 M suivi de décantation sera répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair, il a pour but d'enlever les fines particules qui ont tendance à colmater les colonnes.

IV - TECHNIQUE DE PRECIPITATION.

1 volume de sérum à fractionner

+ 0,5 volume de tampon phosphate physiologique

Mélanger et laisser refroidir à 0°.

Ajouter ensuite progressivement en agitant :

1,5 volume d'éthanol à 36 % préalablement refroidi à
- 10 - 15°.

(Ces opérations peuvent être conduites dans l'enceinte
d'une centrifugeuse réfrigérée ou dans un congélateur.)

Centrifuger ensuite à 10.000 g à - 10° de façon à ob-
tenir un culot compact surmonté d'un surnageant limpide.

Décanner rapidement le surnageant et reprendre par 0,5
volume d'eau physiologique froide.

Effectuer une seconde précipitation dans des conditions
analogues à la précédente mais en utilisant des volumes réduits
de moitié.

Le précipité est aussitôt repris et dissocié en tampon
phosphate 0,02 M au voisinage de 0°. On centrifuge alors à
10.000 g au voisinage de 0°.

Le surnageant contient principalement des IgG.

Une partie des IgM demeure insoluble en phosphate 0,02M

V - FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE.

La colonne est remplie à l'aide de la quantité adéquate
de DEAE-cellulose. La correspondance entre la quantité de pro-
téines et le volume de DEAE est la suivante :

150 mg de protéines nécessitent 1g de DEAE.

1g de DEAE correspond à 8ml de colonne tassée par gra-
vitation.

Le remplissage de la colonne doit faire l'objet de
soins particuliers.

La DEAE-cellulose doit être versée en plusieurs fois,
chaque addition est suivie d'une décantation de façon à enlever
les fines particules surnageantes.

L'échantillon est ensuite passé sur la colonne.

L'éluant est analysé en UV à 280 m μ , ce qui permet de

tracer une courbe d'adsorption, donnant les quantités de protéines en fonction du numéro des tubes. Il ne doit y avoir qu'un seul pic, correspondant aux IgG.

Le contenu des tubes renfermant les IgG est alors remis dans un boyau de dialyse pour être concentré contre du Carbowax.

L'IgG ainsi préparée est alors dosée puis additionnée de Néomycine à 100 μ /ml. La pureté est précisée par analyse immunoélectrophorétique et par précipitation en gel. L'IgG est conservée à + 4° si on l'utilise rapidement, sinon il est préférable de la garder au congélateur à - 25°.

FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DE BENICE JONES

I - PRINCIPE.

Précipitation des protéines de Bence Jones par addition de sulfate d'ammonium jusqu'à 75 % de saturation. (40)

II - REACTIFS ET MATERIEL.

- Boyaux de dialyse.
- Acide acétique 6 N.
- Sulfate d'ammonium.
- Tampon phosphate 0,01 M. NaCl 0,14 M. pH 7,2 = Tampon phosphate physiologique.
- Colonne à chromatographie.
- Collecteur de fractions.

III - MANIPULATION.

- 1) - Dialyser l'urine contre l'eau courante d'un robinet, à froid, pendant 24 heures.
- 2) - Filtrer ensuite l'urine sur un filtre ordinaire pour enlever l'insoluble.
- 3) - Amener l'urine à pH 5,5 (point isoélectrique de Bence Jones) par l'acide acétique 6 N. Mesurer la quantité exacte d'urine
- 4) - Mettre l'urine dans un bac 2 fois plus grand que le volume et sous agitation ; ajouter le sulfate d'ammonium jusqu'à 0,75 de saturation :

Saturation = $766,8\text{g/l}$ à 25°

Exemple : Pour un litre : $0,75 \times 766,8 = 575\text{ g.}$

L'addition doit être lente pour qu'il ne se forme pas d'amas de sulfate d'ammonium non solubilisé.

- 5) - Centrifugation.

- 6) - Le culot est repris en tampon phosphate physiologique, placé ensuite dans un boyau de dialyse. La dialyse est réalisée contre ce même tampon, elle a pour but d'enlever le sulfate d'ammonium. On arrêtera la dialyse lorsque l'addition de chlorure de baryum ne donne plus de précipité de sulfate de baryum.
- 7) - On dosera la teneur en protéines par la méthode de LOWRY.

METHODE DE FRACTIONNEMENT DES IMMUNOGLOBULINES M

I - PRINCIPE.

Après élimination des lipoprotéines, les IgM sont précipitées par l'acide borique. Le culot de centrifugation est ensuite solubilisé en tampon triss ClNaM et filtré sur colonne de Sephadex G 200.

II - MATERIEL.

Colonne pour filtration sur sephadex.

Collecteur de fraction.

III - REACTIFS.

Sulfate de dextrane à 10 %.

Chlorure de calcium, solution molaire.

Eau physiologique.

Acide borique à 7,5 g/l.

Tampon triss ClNaM :

- tri (hydroxyméthyl) méthylamine (puriss) ... 30,25 g

- ClNa 58,5 g

E. D. qsp 1000 ml

Ajuster le pH à 8 à l'aide d'HCL fumant, environ 2,8 ml

Sephadex G 200.

IV - TECHNIQUE.

1) - Elimination des lipoprotéines.

1 volume de sérum

0,04 volume de sulfate de dextrane 10 %

0,1 volume de Cl₂ Ca M.

Le précipité obtenu correspond aux lipoprotéines. A noter que les sérums de WALDENSTROM ne contiennent que peu ou pas de lipoprotéines.

Le surnageant est repris, dialysé contre de l'eau physiologique à + 4° pendant 24 heures.

2) - Précipitation de l'IgM.

Les opérations suivantes sont conduites à + 4°.

- 1 volume de surnageant dialysé (se rapporter au volume de sérum initial).

- 20 volumes d'acide borique à 7,5 g/l.

Laisser 30 mn à + 4° puis centrifuger à 10.000 g.

Le culot de centrifugation est repris par de l'eau physiologique qsp volume de sérum initial.

Une deuxième précipitation est alors conduite dans les mêmes conditions. Le culot est lavé de nouveau par centrifugation cette fois-ci directement avec l'acide borique.

Le culot obtenu est alors repris par 1/4 de volume de tampon triss ClNa.

On déterminera la teneur en protéines de cet échantillon.

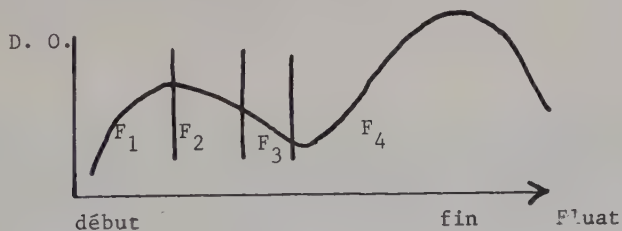
3) - Filtration sur colonne de Sephadex G 200

L'échantillon est alors passé sur la colonne.

On le fera suivre par une solution de sucrose de façon à réduire au minimum la queue de l'anneau de filtration.

L'éluat sera analysé à 280 m μ , soit directement à l'aide d'un lecteur d'effluent, soit tube après tube au spectrophotomètre.

La courbe obtenue a l'aspect suivant :



La fraction F1 contient l'IgM.

Les fractions F2 et F3 de l'IgM et de l'IgA.

La fraction F4 surtout de l'IgG.

Si la purification n'est pas suffisante, on effectuera un deuxième passage sur colonne.

PROCEDES DE CONCENTRATION

L'analyse immunoélectrophorétique, la diffusion radiale en gel ainsi que plusieurs autres techniques demandent une concentration en antigène suffisamment forte pour être effectuées. Les concentrations en protéines des urines et des liquides céphalo-rachidiens sont relativement faibles. Si le problème de la quantité ne se pose pas pour les urines, il n'en va pas de même avec les liquides céphalo-rachidiens. Nous avons étudié en parallèle deux procédés de concentrations :

dialyse et lyophilisation.

I - CONCENTRATION PAR DIALYSE :

Après avoir dosé par la méthode de LOWRY la concentration protéique de la solution à dialyser, elle est placée dans un sac de dialyse que l'on ferme aux deux bouts.

Le sac est alors placé dans une cuve en présence de carbowax en paillettes, et laissé ainsi jusqu'à concentration maximum, environ 10 heures, ce temps est fonction de la quantité à dialyser. Le sac est alors repris et lavé de son carbowax, puis il est placé dans une cuve contenant de l'eau physiologique ou la solution tampon désirée. Après une heure ou deux, la solution concentrée contenue dans le sac de dialyse est récupérée, puis dosée par la méthode de LOWRY pour permettre de l'ajuster à la concentration désirée.

DISCUSSION.

Les sacs de dialyse doivent être, avant usage, portés à ébullition en eau distillée afin de les débarrasser de substances gênantes, libérées lors de la dialyse et qui absorbent en UV à 280 m μ .

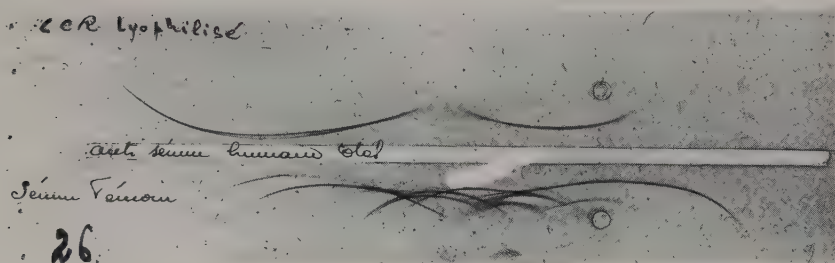
Cette technique est très facile à mettre en oeuvre, elle permet de fortes concentrations si le volume de départ est suffisamment important. La concentration de petits volumes, notamment ceux dont nous disposons pour les liquides céphalo-rachidiens pose certains problèmes eu égard à leur faible concentration en protéines.

II - CONCENTRATION PAR LYOPHILISATION :

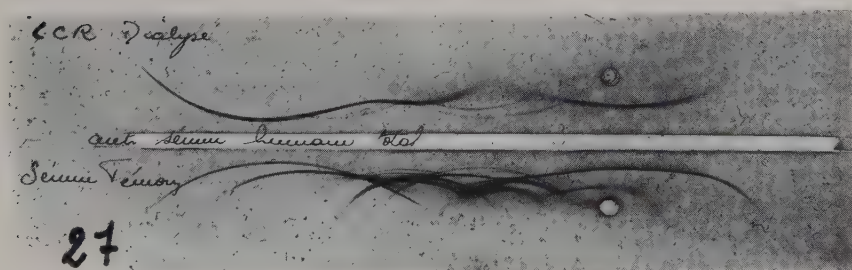
L'appareil utilisé est du type SERRAIL RP 12. L'avantage que présente la lyophilisation réside dans la possibilité de travailler aussi bien sur de grands que sur de très petits volumes ; la récupération du lyophilisat par le solvant permet d'obtenir la concentration désirée compte tenu du volume initial.

Afin d'observer d'éventuelles variations d'un procédé de concentration à l'autre, nous avons effectué, sur un même liquide céphalo-rachidien concentré 50 fois par l'une et l'autre méthode, une analyse immunoélectrophorétique.

Les résultats sont les suivants :



Analyse immunoélectrophorétique réalisée à l'aide d'un pool de plusieurs liquides céphalo-rachidiens normaux concentrés par lyophilisation. L'immunsérum utilisé est un antisérum humain total n° 742 de l'Institut Pasteur.



Analyse immunoélectrophorétique réalisée avec le même pool de L.C.R. concentré par dialyse.

DISCUSSION

Nous pouvons observer certaines modifications dans la vitesse de migration des fractions protéiques. Ainsi qu'une double incurvation de l'arc correspondant à l'albumine de l'échantillon concentré par dialyse. Ce phénomène correspond peut-être à une modification de l'albumine, lorsque le dialysat parvient en fin de dialyse à être complètement sec.

METHODES DE DOSAGE DES PROTEINES

I - COLORATION AU BIURET.

1) - PRINCIPE :

Le principe est basé sur la formation d'un complexe rouge violacé entre les ions Cu^{++} et les liaisons peptidiques des protéines.

2) - REACTIFS :

- Solution de GORNALL :

$\text{SO}_4 \text{ Cu}$, $5\text{H}_2\text{O}$	1,50 g
Tartrate double de Na et K	6,00 g
Na OH pure	30 g
I K	1 g
E. D. qsp	1000 ml

- Solution de ClNa à 200 g/l

- Acide acétique cristallisable.

- Solution de soude normale.

3) - MANIPULATION :

La technique décrite ci-après est celle que nous utilisons pour le dosage des protéinuries fortes. Elle comporte une défécation préalable.

Dans un tube à centrifuger, introduire :

4 - 2 - ou 1 ml d'urine, selon l'importance de la protéinurie,

+ 4 ml de Cl Na à 200 g/l

+ 2 à 3 gouttes d'acide acétique cristallisable.

5 à 10 minutes au Bain Marie bouillant.

Centrifugation.

Décanter en ayant soin de bien essuyer l'intérieur du tube.

Compléter à 2ml par de la soude N.

Ajouter alors 8 ml du réactif de GORNALL.

Attendre 30 minutes.

Lire à 540 m **N** .

Se rapporter à une courbe étalon, faire la correction en fonction de la prise d'essai

4) - CONCLUSION :

Cette technique est celle que nous utilisons pour le dosage des protéines sériques, (Dilution au 1/20, même processus mais sans défécation) et pour les protéinuries sup. à 1g %. En effet, la limite inférieure de sensibilité est de 1 g p.1000.

II - METHODE DE LOWRY. (28)

1) - PRINCIPE ET INTERET :

C'est une modification de la méthode de FOLIN et CIO-CALTEU (14). Le principe de la réaction n'est pas parfaitement connu. C'est une réaction moins spécifique des protéines que le Biuret. Le développement de la coloration en fonction de la concentration en protéines ne suit pas la loi de BEER-LAMBERT. Son principal intérêt réside dans la grande sensibilité de la méthode. Il est en effet possible de doser des échantillons compris entre 5 et 100 μ g de protéines.

2) - REACTIFS :

- a - $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ à 2 % dans une solution de NaOH N/10.
- b - $\text{SO}_4 \text{Cu}$, $5\text{H}_2\text{O}$ à 0,5 % dans une solution de tartrate de Na ou de K à 1 %.
- c - Solution cuprique alcaline, à rejeter après 1 jour. Mélanger 50 ml de a avec 1 ml de b.
- d - Réactif de FOLIN :

On dissout 100 g de tungstate de sodium et 25 g molybdate de sodium dans 700 ml d'eau distillée ; on ajoute 50ml d'acide phosphorique à 85 % et 100 ml d'acide chlorhydrique concentré RP ; cette solution portée à ébullition douce pendant 10 heures environ sous réfrigérant à reflux, reçoit ensuite 150 g de sulfate de lithium, 50 ml d'eau distillée, puis quelques gouttes de brome ; après avoir chassé l'excès de brome par ébullition pendant quinze minutes, on complète la solution refroidie à 1 l avec de l'eau distillée, puis on la passe sur verre fritté ; le réactif présente une coloration jaune. Titré par une solution de soude, 0,1 N, le réactif ainsi préparé doit présenter une normalité d'environ 2 N ; avant son utilisation, on l'amène à une normalité de 1 N. L'état d'oxydation du réactif est

important ; il doit présenter une teinte jaunâtre. Quelquefois, il peut virer au vert ; dans ce cas, il est nécessaire de l'oxyder par addition de quelques millilitres d'eau de brome, puis de porter à ébullition pour chasser l'excès de brome. Le réactif de FOLIN et CIOCALTEU peut se conserver plusieurs mois au froid et à l'obscurité.

3) - MANIPULATION :

Ajouter l'échantillon (5 à 100 μ de protéines dans 0,2 ml ou moins) à 1 ml de réactif c.

Bien mélanger et attendre 10 minutes à la température ambiante.

On ajoute ensuite 0,10^{ml} du réactif d.

Laisser venir la coloration pendant 30 minutes.

Lire de préférence :

- à 750 m μ si l'échantillon contient de 5 à 25 μ de protéines,

- à 500 m μ si la quantité est supérieure.

Se reporter à la courbe étalon.

4) - CONCLUSION :

Technique très sensible et suffisamment reproductible compte-tenu des remarques faites plus haut.

Dans le cas où l'on opère avec une protéine connue, il est recommandé d'utiliser cette protéine pour effectuer la gamme étalon.

III - DOSAGE DES PROTEINES PAR ABSORPTION A 280 m μ .

1) - PRINCIPE :

Les protéines absorbent en ultra violet à 280 m μ . Leur coefficient d'extinction est donné en fonction de la longueur d'onde utilisée (280 m μ), de l'épaisseur de la solution traversée (1 cm), et de la concentration (1 %).

$$E_{\lambda} = \frac{1}{c \times d} \cdot \log_{10} \cdot \frac{I_0}{I}$$

d'où E. 280 = D.O. d'une solution à 1 %.

Exemples de coefficient d'extinction :

IgG E. 280 = 13,8

IgM E.280	=	13,3
IgA E.280	=	13,4
Album. E.280	=	5,8

2) - CONCLUSION :

Cette méthode à l'énorme avantage d'être extrêmement rapide. Elle se passe bien sûr de témoin, et de plus, elle est assez sensible. Toutes ces qualités sont subordonnées à la pureté de la protéine étudiée.

I - DIFFUSION RADIALE.

Les méthodes immunochimiques de dosages des antigènes sont relativement nombreuses, il faut cependant accorder une place privilégiée aux méthodes d'immunodiffusion. En 1946, OUDIN le premier, définit les principes de l'immunodiffusion simple en tube (38). En 1947, OUCHTERLONY, introduit la diffusion double (37). Ces techniques riches en applications dans le domaine de l'analyse qualitative, furent ensuite utilisées pour le dosage des antigènes. Il faut citer les travaux de CROWLE (8), FAHEY (12), et de MANCINI (32) (33) qui présentent un intérêt particulier, car la technique d'immunodiffusion radiale permet une relation linéaire entre la concentration de l'antigène et la surface du précipité à la fin de la diffusion. La technique de VERGANI, en utilisant l'acétate de cellulose comme milieu de diffusion semble intéressante car les quantités d'antisérum utilisés sont faibles (50).

Nous avons effectué nos dosages d'antigènes par diffusion radiale, d'une part à l'aide du matériel fourni par les Laboratoires HYLAND :

- HYLAND immunoplate human G immunoglobulin test réf. 85 124
- HYLAND immunoplate human M Immunoglobulin test réf. 85 126
- HYLAND immunoplate human A Immunoglobulin test réf. 85 130

Nous avons suivi le processus opératoire indiqué par le fabricant. D'autre part, nous avons été amené à mettre au point une technique de précipitation en gel compte tenu des difficultés d'obtenir des résultats reproductibles avec le matériel fourni par les Laboratoires HYLAND.

MATERIEL ET REACTIFS :

- plaques en verre de 40 x 75 mm
- agarose
- soluté physiologique de Cl Na à 8,5 p.1000
- immunsérums anti IgG, IgA et IgM distribués par l'Institut Pasteur.

TECHNIQUE.

- 10 ml d'une solution d'agarose à 1 p.100 en eau physiologique sont placés au bain marie à 60°,

- 1 ml d'immunsérum est placé de même au bain marie à 60°.

Après équilibre des températures, le mélange est effectué soigneusement de manière à avoir une dispersion parfaite des anticorps dans la solution d'agarose.

Les plaques, placées horizontalement, sont alors recouvertes de 5,5 ml de la solution de l'immunsérum en agarose.

Après gélification les plaques sont mises 30 minutes en chambre humide à + 4°.

Les trous sont alors faits à l'emporte pièce (Gelman), 15 trous par plaque, distants de 13 mm.

Les antigènes sont distribués précautionneusement à l'aide de pipettes Pasteur rééfilées, jusqu'à ce que le niveau affleure la surface du gel. 3 étalons dont la teneur en antigène est connue sont disposés de la même manière.

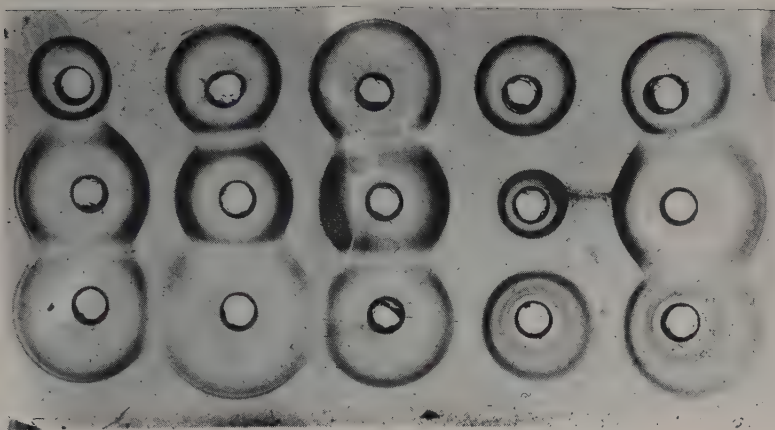
Les plaques sont placées en chambre humide à 37° pendant 48 heures.

Les diamètres des cercles de précipitation sont mesurés avec exactitude soit à l'aide d'un viseur spécial, soit à défaut à l'aide d'un agrandisseur photographique.

Les valeurs obtenues sont portées sur un papier semi-logarithmique : les concentrations en antigènes sur l'échelle logarithmique, les diamètres des cercles de précipitation sur l'échelle linéaire.

La courbe reliant les points obtenus pour les antigènes étalons doit être une droite.

Les résultats obtenus avec les immunsérums de l'Institut Pasteur nous ont donné des résultats très reproductibles.



Dosage d'IgG par diffusion radiale. L'immunsérum utilisé est le sérum anti IgG fourni par l'Institut Pasteur. La surface des cercles obtenus est proportionnelle à la quantité de l'IgG contenue dans les solutions à doser.

II - ETABLISSEMENT D'UNE COURBE DE PRECIPITATION.

1) - PRINCIPE.

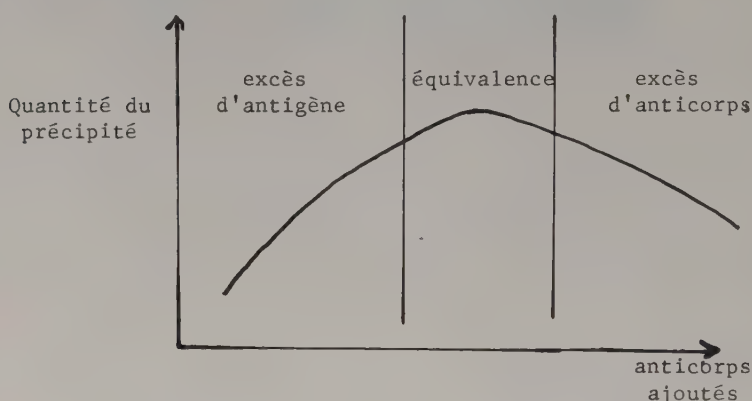
L'établissement d'une courbe de précipitation permet de déterminer le rapport optimal de précipitation anticorps/antigène. Si l'on opère avec un antigène pur, il est possible de déterminer d'une part la richesse en anticorps de l'antisérum, le nombre de déterminants antigéniques de l'antigène d'autre part.

2) - APPLICATION.

Titration d'un antisérum à l'aide d'un antigène connu. Dans une série de tubes on distribue une quantité constante d'antigène. Puis l'antisérum est ajouté en quantité croissante dans chaque tube. On complète, pour opérer à volume constant, avec une solution physiologique de ClNa

La galerie ainsi réalisée sera abandonnée 2 H. à la température du laboratoire puis 48 heures à $+ 4^{\circ}$. Le précipité formé est séparé par centrifugation à $+ 4^{\circ}$ puis lavé trois fois avec de l'eau physiologique froide. Chaque précipité est alors repris par de l'acide acétique 0,25 N. L'absorption est lue à 280 m μ .

La courbe de précipitation est alors tracée ; elle présente trois parties : une partie ascendante correspondant à un excès d'antigène ; un plateau appelé zone d'équivalence où tous les anticorps et les antigènes sont précipités ; une partie descendante correspondant à un excès d'anticorps.



Connaissant la quantité ajoutée dans chaque tube la quantité totale de protéine de la zone d'équivalence, il est possible d'en déduire : la quantité d'anticorps présents dans l'antisérum, le rapport anticorps/antigènes du système.

III - DOSAGE PAR HEMAGGLUTINATION ET INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Ces méthodes faisant l'objet de notre travail, elles seront étudiées plus particulièrement dans les chapitres ultérieurs.

CRITERES DE PURETE DES PROTEINES

Les critères de pureté sont extrêmement nombreux, nous avons surtout utilisé les critères de migration électrophorétique, les critères immunologiques et immunoélectrophorétiques.

I - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE.

1) - MATERIEL ET REACTIFS :

- redresseur de courant,
- cuve de migration,
- bande d'acétate de cellulose "Cellogel",
- tampon véronal, pH 8,6 :

véronal sodique	19,6 g
acétate de Na	13 g
HCL N/10	135 ml
E. D. qsp	2000 ml

- ponceau S 0,5 g dans 100 ml d'acide trichloracétique,
- acide acétique à 5 %,
- acide acétique à 80 %,
- méthanol.

2) - MANIPULATION :

Les bandes d'acétate de cellogel sont rincées en eau distillée puis placées en tampon véronal pendant 15 minutes. Elles sont ensuite placées dans la cuve à migration, la surface mate de la bande tournée vers le haut. Les deux bouts doivent tremper dans les deux bacs préalablement remplis de tampon. On dépose ensuite l'échantillon à 1,5 cm du côté cathodique.

La migration est alors effectuée pendant 2 heures 15 sous une tension de 120 volts.

On colore ensuite 5 minutes au ponceau. Cette opération est suivie de trois à quatre bains de décoloration en acide acétique à 5 % pendant 15 minutes.

La détermination quantitative peut être réalisée de différentes manières : soit élution des fractions par l'acide acétique à 80 % et lecture au photopète à 520 m μ . Un coefficient de correction doit être apporté pour l'albu-

mine. Cette méthode est plus longue que la suivante mais aussi plus reproductible ; soit lecture des bandes au densitomètre : la transparence est obtenue par passage dans un bain déshydratant de méthanol pur (30 secondes) suivi d'un bain en solution de méthanol (87 ml) + acide acétique (12 ml) + glycérol (1 ml) pendant 60 secondes.

La bande de cellogel est ensuite placée sur une lame de verre légèrement préchauffée, puis après avoir éliminé les bulles d'air comprises entre la bande et la lame, l'ensemble est placé à 70° pendant 3 minutes. La lame de verre est ensuite retournée sur une feuille de papier où on la laisse jusqu'à refroidissement. La trame de la bande d'acétate de cellulose est alors transparente. Les fractions protéiques restent colorées.

3) - CONCLUSION :

La séparation sur acétate de cellulose est meilleure que celle obtenue sur papier. Ainsi un sérum humain entier donne en moyenne 7 à 9 fractions.

Ce procédé a l'avantage d'être facile à mettre en oeuvre. Son pouvoir séparateur est cependant faible en comparaison de celui obtenu à l'aide de la technique suivante.

II - ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE.

1) - PRINCIPE :

La séparation des protéines est obtenue par migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide. Ce dernier est obtenu par polymérisation d'un monomère principal, l'acrylamide, et d'un monomère de liaison, le N N' méthylène bis acrylamide. La gélification se fait à l'abri de l'air, en présence d'un catalyseur et d'un oxydant. Cette méthode fut proposée en 1959 par RAYMOND et WEINTRAUB (41).

2) - MATERIEL ET REACTIFS :

Le matériel utilisé est celui de la maison PLEUGER. Nous avons suivi les indications fournies par le fabricant.

3) - CONCLUSION :

Cette technique possède un très haut pouvoir séparateur. Elle est très utile dans l'appréciation de la pureté d'une substance.

III - ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE AGAROSE

1) - PRINCIPE :

Le gel est constitué du mélange homogène d'un polymère d'acrylamide et d'un polysaccharide naturel, (agarose). Cette méthode a été proposée par URIEL en 1966. (48) (49).

2) - MATERIEL ET TECHNIQUE :

Nous avons utilisé le procédé rapporté par URIEL dans le livre de FINE et ROPARTZ sur les techniques d'électrophorèse de zone, publié aux Editions de la Tourelle.

3) - INTERET DE LA TECHNIQUE :

Cette méthode permet l'obtention de gels dont le pouvoir séparateur est aussi bon que ceux obtenus avec le gel d'acrylamide, mais dont les propriétés mécaniques facilitent leur utilisation.

IV - DIFFUSION DOUBLE EN PLAQUE.

Les lames utilisées sont lavées et pré-enduites d'agarose selon la méthode décrite dans la technique d'analyse immunoélectrophorétique. Les trous sont réalisés à l'emporte pièce (Gelman) selon le schéma désiré. Le gel est une solution d'agarose à 1 % en eau physiologique. Les procédés de dépôt d'échantillon, de lavage, séchage et coloration des lames sont analogues à ceux utilisés dans la technique d'analyse immunoélectrophorétique. Les immunosérums sont de différentes provenance :

- Institut Pasteur Paris.
- C. T. S. Bois-Guillaume - ROUEN.
- Laboratoires HYLAND, SECLIN (Nord)
- Laboratoires BEHRINGWERKE AG Biotrol.
- Institute of seravaccines - PRAGUE (Tchequoslovaquie).

V - ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE.

1) - PRINCIPE :

Cette méthode comporte une séparation électrophorétique des protéines suivie d'une identification immunologique.

Elle fut proposée la première fois par GRABAR en 1953 (16) (17).

Parmi les nombreux auteurs qui ont étudié cette technique, il faut citer SCHEIDEGGER qui propose une microtechnique en 1955 (42) ; FELGENHAUER qui effectue la migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide (13).

2) - MATERIEL ET TECHNIQUES :

Nous utilisons le matériel fourni par la Maison GELMAN :

- redresseur,
- cuve à migration,
- enporte-pièce, etc ...

3) - REACTIFS :

- agarose,
- tampon véronal pH 8,6,

véronal sodique	20,6 g
véronal acide	3,7 g
E. D. qsp	1 l

Faire fondre les deux véronal à 80° environ, laisser refroidir et compléter à 1 litre. Vérifier le pH.

- colorant :

amidoschwartz	0,50 g
(noir bleu naphtol fluka, Biolyon)	
acide acétique	50 ml
alcool absolu	500 ml

4) - MANIPULATION :

Préparation des lames : après avoir été lavées au mélange sulfochromique, les lames sont conservées dans l'alcool. Elles sont séchées à l'air ou à la flamme. On les enduit à l'aide d'un pinceau, d'une fine pellicule d'agarose à 1 % en eau distillée.

On laisse sécher 5 minutes à 100°. Cette fine couche d'agarose permettra une meilleure adhérence du gel d'agarose. Les lames placées sur leur support dans une position rigoureusement horizontale sont colmatées à l'aide de la solution d'agarose préparée comme suit :

Ajouter à 1 g d'agarose 50 ml d'eau distillée, mettre dans un bain marie et chauffer très lentement jus-

qu'à l'obtention d'un liquide homogène et transparent sans qu'il se produise d'ébullition. L'agarose se dissout très facilement aux environs de 95 °.

Ajouter alors 50 ml de tampon véronal préalablement réchauffé à plus de 50°. Le colmatage des plaques dont nous avons parlé plus haut est nécessaire avec le matériel GELMAN, pour éviter l'écoulement de la solution d'agarose en dessous du support. La solution d'agarose est alors coulée à 50° sur les lames à raison de 15 ml pour 3 lames. Attendre 15 minutes pour que le gel se forme. Mettre ensuite les lames 60 minutes dans une enceinte humide. Faire les trous à l'emporte pièce suivant le schéma désiré. Enlever la gélose des trous à l'aide d'une trompe à vide. Les échantillons à analyser sont alors distribués à l'aide de pipettes Pasteur réeffilées jusqu'à ce que la surface de l'échantillon soit de niveau avec la gélose.

Mettre les supports contenant les lames dans la cuve à électrophorèse préalablement remplie de tampon. Appliquer les bandelettes imprégnées aux deux bouts des portoirs de manière à fermer le circuit entre les pôles négatifs et positifs.

Mettre sous tension 2 heures 30 à 250 volts, soit 10 milliampères par support, (6 lames). Enlever ensuite la gélose de la rigole centrale et la remplir à l'aide de l'antisérum désiré. Les lames doivent être bien horizontales. Laisser 18 à 24 heures en chambre humide.

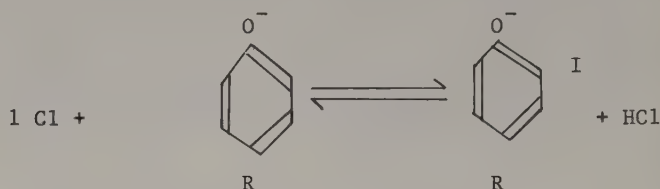
Placer alors les lames dans 2 solutions de ClNa à 9 p.1000 de façon à laver le gel des protéines non précipitées. Rincer une heure en eau distillée ; puis placer des bandes de papier filtre sur les lames en prenant soin de n'emprisonner aucune bulle d'air. Dessécher une nuit à l'étuve à 37°.

Enlever le papier filtre et colorer les lames en les plongeant vingt minutes dans la solution d'amidoschwartz. Décolorer ensuite à l'eau du robinet, 30 minutes environ.

Laisser sécher à température du Laboratoire.

I - PRINCIPE :

Il consiste à mettre en contact du chlorure d'iode radioactif avec la protéine : l'iode s'échange avec les hydrogènes des amino-acides aromatiques donnant d'une part la protéine marquée à l'iode, d'autre part, de l'acide chlorhydrique :



La technique ci-après s'inspire de celle de ZAPPACOSTA et ROSSI (52) qui appliquent aux immunoglobulines G, la technique de MAC FARLANE (29) modifiée par TOI et AL (46).

Certaines modifications apportées à la technique de ZAPPACOSTA nous ont été communiquées personnellement par Monsieur MANGALO (Institut Pasteur de GARCHES).

II - MATERIEL ET REACTIFS :

- Chlorure d'iode redistillé,
- Solution saturée d'iodure de Na marqué, sans entraîneur, sans réducteur. Solution à 20 mC sous un volume de 0,5 ml (C. E. A.),
- tampon phosphate 0,1 M Cl Na 0,05 M pH 7,2.

III - MANIPULATION :

- Distillation du chlorure d'iode :

Le point d'ébullition du chlorure d'iode étant de 95°, le bain marie de distillation peut être réalisé à l'aide d'une solution saturée de chlorure de Na. Il faut opérer sous une hotte, à cause des vapeurs dégagées. On rejette la tête de distillation.

- Le chlorure d'iode obtenu est ajouté à une solution saturée de ClNa de façon à obtenir une concentration en chlorure d'iode égale à 8×10^3 M. Pour faciliter l'opération, on utilise une effilure de pipette Pasteur tarée dans laquelle on introduit le chlorure d'iode par capillarité.

- On ajoute alors à cette solution l'iode de Na radioactif. On opère de façon à ne jamais descendre en dessous de la 1/2 saturation en Na Cl. La quantité d'INA ajoutée dépend de sa concentration en élément marqué. On peut opérer avec 1 mC dans moins d' 1 ml. On laisse reposer toute la nuit, pour permettre à l'I de l'INA de s'échanger avec l'I de ClI. La solution ainsi préparée se conserve très bien plusieurs mois, ceci bien sûr pour l'Iode 125 dont la période est de 60 jours, l'Iode 131 dont la période est de 8 jours doit être utilisé assez rapidement.

- Marquage de la protéine : cas d'une immunoglobuline G la concentration protéique doit se situer entre 3 et 11 x 10⁻⁵M en tampon phosphate 0,1 M, ClNa 0,05 M, soit pour une IgG entre 5 et 17 mg/ml. Le ClI est ajouté lentement à la solution protéique, celle-ci étant agitée pour réaliser une bonne homogénéisation. La quantité de ClI à ajouter doit conduire à la fixation de 3 molécules d'Iode par molécule de protéine.

Il est aisé de calculer la quantité d'ICl à utiliser, connaissant :

- la molarité de l'ICl (8×10^{-3} M)
- la dilution apportée par NaI (de toute façon la molarité finale de l'ICl doit être supérieure à : 4×10^{-3} M)
- la molarité de la protéine et la quantité de solution protéique à marquer.

On laisse ensuite 1/2 heure au repos à la température du Laboratoire ou à froid.

- Purification :

Les atomes d'Iode fixés sont éliminés par dialyse à + 4° en 2 à 3 jours. L'activité résiduelle de l'eau de dialyse doit être égale au 1/10.000 de l'activité initiale. Il est préférable d'arrêter à ce moment-là la dialyse, une attente plus longue pourrait amener une dissociation de l'iode fixé sur la protéine.

Exemple de calcul :

Soit 5 ml d'une solution d'IgG à 15 mg/ml

La molarité est de 1×10^{-4} M.

Si la molarité de la solution d'ICl après addition de l'INA est de $7,5 \times 10^{-3}$ M ; nous pouvons écrire :

3 iode par IgG correspond à 3 fois plus de molécules d'ICl que de protéine, donc :

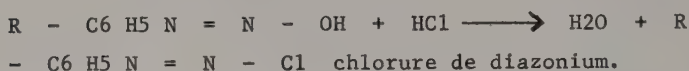
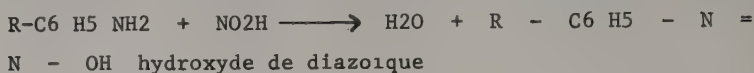
$$3 \times 5 \text{ ml} \times 10^{-4} = X \times 7,5 \times 10^{-3}$$

X = 0,2 ml = quantité d'ICl à ajouter à 5 ml de la solution d'IgG à 15 mg/ml.

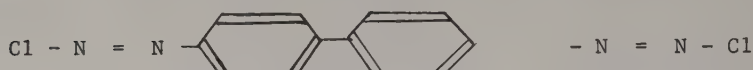
PREPARATION DE LA BENZIDINE BIS-DIAZOTEE

I - PRINCIPE :

Les sels de diazonium furent découverts par Peter GRIESS. Ils sont obtenus par action de l'acide nitreux sur les amines primaires aromatique.



Dans le cas de la benzidine, nous obtenons :



II - REACTIFS :

Benzidine, (Merk)

HCl N,

NO₂ Na

III - TECHNIQUE :

Pour l'obtention de 20 ml de B. B. D. :

1) - solution chloridrique de benzidine :

- benzidine	0,092 g
- E. D.	12 ml
- HCl H	3,6 ml

2) - solution de nitrite de sodium :

- NO ₂ Na	0,070 g
- E. D.	5 ml

Refroidir à 0° dans un mélange glace et sel et verser goutte à goutte en agitant légèrement la solution de nitrite de sodium dans la solution de benzidine.

Laisser reposer 10 à 15 minutes à 0° puis répartir à froid dans les petits tubes bouchés que l'on conservera au congélateur à - 25°.

METHODE DE PREPARATION D'ANTICORPS PURS PAR LES IMMUNOADSORBANTS

- PRINCIPE :

La technique utilisée est celle d'AVRAMEAS. Elle consiste en une agrégation de l'antigène par le glutaraldéhyde suivi d'une adsorption de l'antisérum. Après lavage pour enlever les protéines non spécifiques, les anticorps sont élués par un tampon glycine pH 2,5 (3). Certaines modifications de la technique ont été données oralement par l'auteur à Monsieur PILLOT qui nous les a transmises.

II - REACTIFS ET MATERIEL :

- broyeur,
- albumine bovine,
- tampon phosphate 0,1 M pH 7,
- glutaraldéhyde,
- tampon phosphate 0,2 M pH 7,2 - 7,4,
- tampon glycine 0,1 M HCl pH 2,5,
- tampon phosphate physiologique.

III - MANIPULATION :

1) - Agrégation de l'antigène protéique :

- 200 mg d'antigène pur,
- + 800 mg d'albumine bovine, 1'albumine bovine jouant en quelque sorte un rôle de support entraîneur dans l'agrégation.
- + 20 ml tampon phosphate 0,1 M pH 7.

Agiter à la température du Laboratoire, puis ajouter goutte à goutte :

4 ml de glutaraldéhyde à 25 p.1000 en eau distillée. L'agitation est maintenue pour avoir une bonne homogénéisation. Laisser ensuite le gel se former trois heures à la température du Laboratoire.

2)- Lavage de l'antigène :

1 mg d'antigène insolubilisé est dispersé dans 400 ml de tampon phosphate 0,2 M pH 7,2 - 7,4.

On homogénéise avec un broyeur puis on lave par centrifugation 15 minutes à 3000 tours à + 4°. Ces opérations sont répétées jusqu'à ce que le surnageant de lavage n'absorbe plus à 280 m μ .

L'antigène insoluble est alors repris par le tampon glycine 0,1 M HCl pH 2,5 ; puis centrifugé, cette opération est refaite une deuxième fois. Le culot repris et lavé en phosphate 0,2 M ne doit pas avoir un surnageant absorbant à 280 m μ , (généralement après deux lavages).

La suspension finale est doucement agitée puis laissée au repos une nuit à + 4°. Le surnageant est décanté et le précipité repris par 200 ml de tampon phosphate physiologique. Après 30 minutes au repos, on décante le surnageant pour enlever les fines particules. Cette opération est reprise plusieurs fois en réduisant chaque fois le temps de sédimentation.

On alterne ensuite deux lavages en tampon d'élution, avec deux lavages en tampon phosphate physiologique.

3) - Adsorption des anticorps :

La mise en contact de l'antigène agrégé et de l'antisérum peut se faire en béccher ou dans une colonne nous avons préféré le second procédé.

La grandeur de la colonne dépend de la quantité d'antigène, on le prépare comme une colonne à chromatographie.

L'antisérum est alors passé lentement ; on pourra arrêter de temps en temps l'écoulement de façon à permettre une fixation maximum d'anticorps. La quantité d'antisérum à passer dépend de la quantité d'antigène. En général, l'immunoabsorbant adsorbe poids à poids l'anticorps (1 g d'antigène adsorbe 1 g d'anticorps).

L'antisérum ayant traversé la colonne sera conservé de façon à vérifier son épuisement.

La colonne est ensuite lavée à l'aide du tampon phosphate physiologique jusqu'à ce que l'effluent absorbe moins de 0,04 D.O. à 280 m μ . On place alors la colonne à + 4° sur un collecteur de fractions tout en continuant de laver jusqu'à ce que l'ensemble soit équilibré à + 4°.

On élue d'abord par le tampon glycine 0,1 M HCl pH 2,5 préalablement mis à + 4°. Les tubes contenant les anticorps sont collectés et dialysés aussitôt contre du tampon phosphate physiologique, puis filtrés sur filtre millipore.

La colonne est lavée, conservée à + 4° avec 1 % de Butanol en tampon phosphate physiologique.

ETUDE DE L'HEMAGGLUTINATION PASSIVE

I - INTRODUCTION.

Afin de permettre une étude comparative des trois techniques de sensibilisation, il est nécessaire de standardiser tous les éléments qui n'entrent pas directement dans les modalités propres à la technique. Nous envisagerons donc successivement : les suspensions globulaires, les antigènes, les techniques de sensibilisation, de titrage, ainsi que le matériel utilisé.

1) - MATERIEL UTILISE :

- centrifugeuse,
- plaque à hématagglutination 80 trous (10 x 8) modèle O.M.S. distribué par MECA VIGOR,
- rhéomètre de différents calibres pour effectuer les dilutions d'antisérum en tubes, les répartitions en plaques.

2) - SUSPENSIONS GLOBULAIRES :

Les globules rouges utilisés proviennent de moutons. Le prélèvement et la formolisation sont réalisés toujours de la même manière ainsi que nous les avons décrits dans le chapitre des techniques. La concentration globulaire est déterminée par hématocrite, le nombre réel de globules est obtenu par comptage à la cellule et au compteur optique de particule FISHER.

La correspondance entre l'hématocrite et le nombre de globules est la suivante : hématocrite : 10 % = 1.300.000 globules rouges formolés par mm³. Les globules rouges formolés ne sont conservés à + 4° qu'un mois. En effet, nous préférons renouveler les lots tous les mois, une conservation trop longue amène une certaine instabilité de la suspension globulaire. Les premiers stigmates de cette instabilité se traduisent par une augmentation de la sensibilité pour des doses d'antigène et de liant identiques.

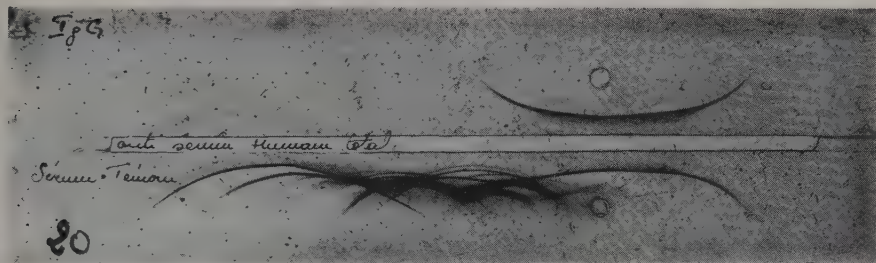
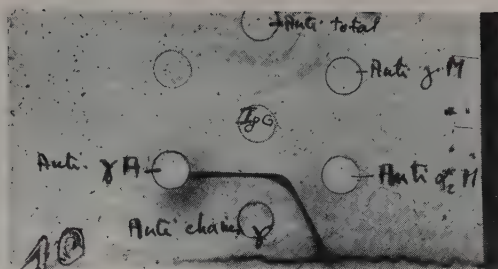
3) - ANTIGENE :

Nous avons utilisé de l'IgG humaine comme antigène. Elle nous a été fournie en poudre par le Centre National de Transfusion Sanguine, ainsi que par le Centre de Transfusion Sanguine de ROUEN. Il s'agit d'IgG de sérums humains normaux.

Etude de la pureté de l'IgG par double diffusion en plaque.

L'IgG est placée dans le trou central, les immunosérums dans les trous périphériques.

L'arc de précipitation situé entre les immunosérums anti IgG et anti γ_M vient de l'épuisement de ce dernier par de l'IgG lors de sa préparation.



Etude de la pureté de l'IgG par analyse immunoélectrophorétique.

4) - TECHNIQUES STANDARD DE SENSIBILISATION :

Les trois éléments intervenant dans la sensibilisation sont : la suspension globulaire, l'antigène et l'agent de fixation. Les principaux paramètres intervenant sont leurs concentrations et le volume sous lequel ils sont distribués.

Afin de simplifier l'interprétation des résultats nous avons préféré opérer dans tous les cas à volume constant : seule la concentration varie. D'autre part, la chronologie des différentes phases de la sensibilisation est toujours la même : mise en présence des globules rouges formolés avec l'antigène, addition de l'agent de fixation, incubation, lavage puis titrage. Quelques essais sur lesquels nous reviendrons par la suite nous ont montré qu'il était préférable d'utiliser les globules rouges en culot, c'est-à-dire à 100 %. La technique standard de sensibilisation est donc la suivante :

- a) - 1 ml de globules rouges formolés à 10 %
 - centrifugation 5 mn à 1.600 t/mn,
 - décantation.
 - + 1 ml d'agent de fixation en tampon phosphate physiologique.
- L'addition de ce dernier doit être faite très rapidement en agitant de manière à réaliser une bonne homogénéisation.

b) - incubation 15 minutes.

- c) - Centrifugation suivie de décantation. Puis trois lavages successifs à l'aide de 5 ml de tampon phosphate physiologique de façon à ramener les globules à 2 %, concentration utilisée pour le titrage. Après le 3ème lavage, les globules rouges sont repris dans un volume de 5 ml (2 %) à l'aide d'une solution d'albumine bovine à 3 p.1000 en tampon phosphate physiologique.

- 5) - TECHNIQUE DE TITRAGE :

Le titrage est réalisé à l'aide de l'immunsérum anti IgG distribué par l'Institut Pasteur de PARIS ; il est utilisé dilué de demi en demi en tube. Chaque dilution est ensuite répartie dans les cupules des plaques à hémagglutination sous un volume de 0,2 ml. Chaque cupule reçoit ensuite 0,2 ml de tampon phosphate physiologique. Ce volume mort sera remplacé dans la technique d'inhibition de l'hémagglutination par l'antigène à doser. Les globules rouges sensibilisés sont alors ajoutés sous un même volume de 0,2 ml.

Deux témoins sont effectués :

- témoin globules rouges non sensibilisés : G.R.N.S.
 - 0,2 ml de globules rouges non sensibilisés
 - + 0,2 ml d'immunsérum anti IgG à sa concentration la plus forte
 - + 0,2 ml de tampon phosphate physiologique.
- témoin globules rouges sensibilisés : G.R.S.
 - 0,2 ml de globules rouges sensibilisés
 - + 0,4 ml de tampon phosphate physiologique.

La plaque est homogénéisée puis laissée en repos à la température du Laboratoire. La lecture est effectuée après 1 heure 30.

6) - MODE DE LECTURE :

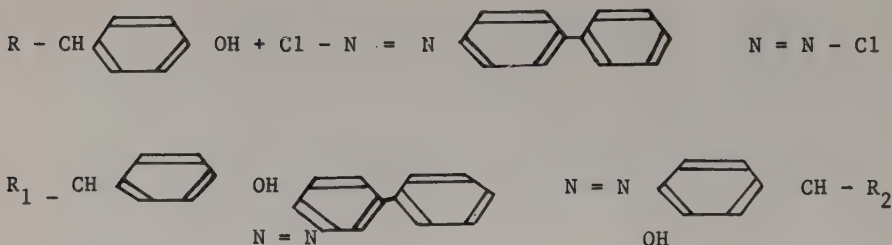
L'hémagglutination est appréciée en croix +.

4 + correspondant à une hémagglutination totale,
3 +, 2 +, 1 +, à des hémagglutinations partielles allant
en décroissant. Le 0 correspond à un culot de globules
parfaitement sédimentés.

II - METHODE UTILISANT LA BENZIDINE-BIS-DIAZOTEE.

1) - PRINCIPE :

Cette méthode fut proposée pour la première fois par PRESSMAN, CAMPBELL et PAULING en 1942 (39). Elle fut reprise par de très nombreux auteurs parmi lesquels il faut citer principalement STAVISKY et ARQUILLA (45). La Benzidine-bis-diazotée dont la préparation est décrite dans le chapitre réservé aux techniques est un composé éminemment réactif ayant la propriété de contracter des liaisons de covalence avec les aminoacides aromatiques selon le schéma suivant :



Si le radical R1 appartient à un globule rouge, R2 à l'antigène, la fixation de l'antigène est ainsi réalisée sur le globule, ce dernier acquérant une spécificité antigénique nouvelle. Les liaisons sont très solides puisque de covalence.

2) - TECHNIQUE.

Elle est identique à la technique standard, la seule modification apportée est la température de 0° à laquelle la sensibilisation doit être réalisée. Le culot globulaire repris par 1 ml d'antigène est placé à 0° jusqu'à équilibre de température.

La B.B.D. est décongelée puis diluée en tampon phosphate physiologique froid ; elle est alors ajoutée dans le tube contenant les globules et l'antigène.

L'incubation d'un quart d'heure est réalisée à la température de Laboratoire. Lavage et titrage sont réalisés comme dans la technique standard.

3) - ETUDE DES PRINCIPAUX PARAMETRES :

Les deux paramètres nous paraissant les plus importants sont d'une part la concentration en B.B.D., la concentration en IgG d'autre part.

Nous avons utilisé la B.B.D. à trois concentrations différentes, 1/15, 1/30, 1/60 l'IgG à 2 p.1000, à 0,5 p.1000, à 0,125 p.1000.

Les résultats sont les suivants :

Dilution de l'immunsérum anti IgG		1/1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	témoin GRS
B.B.D.	IgG p.1000								
1/15	0,125	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	0
1/15	0,500	4+	4+	4+	4+	3+	0	0	0
1/15	2,000	4+	4+	4+	4+	0	0	0	0
1/30	0,125	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	0
1/30	0,500	4+	4+	4+	4+	+	0	0	0
1/30	2,000	4+	4+	4+	4+	0	0	0	0
1/60	0,125	3+	3+	3+	3+	2+	0	0	0
1/60	0,500	4+	4+	4+	4+	+	0	0	0
1/60	2,000	4+	4+	4+	2+	0	0	0	0
0	0,125	2+	2+	2+	2+	+	0	0	0
0	0,500	4+	4+	4+	4+	0	0	0	0
0	2,000	4+	4+	4+	2+	0	0	0	0
témoins globules non sensibilisés		0							

4) - CONCLUSION :

La sensibilité augmente avec une baisse de la concentration en antigène. Les conditions optimales semblent correspondre à une concentration de l'antigène de 0,5 p.1000 et à une dilution de la B.B.D. au 1/30.

Les trois dernières colonnes représentent un témoin de sensibilisation sans benzidine bis diazotée ; nous constatons que la fixation a lieu mais que les sensibilisés sont relativement faibles.

III - METHODE UTILISANT LE CHLORURE DE CHROME.

1) - PRINCIPE :

Cette méthode proposée pour la première fois par JANDL et SIMMONS en 1957 (20) utilise les ponts métalliques formés par le chrome trivalent pour fixer les antigènes à la surface des globules rouges. Cette méthode a été reprise par KRITZMAN en 1958 pour fixer des IgG (25) puis par FUDENBERG et AL (15). Nous l'avons étudié pour notre part à l'aide de globules rouges formolés.

2) - TECHNIQUE :

Identique à la technique standard. La manipulation est effectuée à la température du Laboratoire.

3) - ETUDE DES PRINCIPAUX PARAMETRES :

Le chlorure de chrome est utilisé à : 1 p.1000, à 0,1 p.1000, à 0,01 p.1000. L'IgG à 0,125 p.1000, à 0,5 p.1000, 2 p.1000. Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau suivant :

Dilution de l'immunsérum anti IgG		1/1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000	témoin GRS
Cl3Cr	IgG								
1/1000	0,125	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+
1/1000	0,500	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+
1/1000	2	4+	4+	4+	+	0	0	0	0
0,1/1000	0,125	4+	4+	4+	4+	2+	0	0	0
0,1/1000	0,500	4+	4+	4+	4+	2+	0	0	0
0,1/1000	2	4+	4+	4+	+	0	0	0	0
0,01/1000	0,125	2+	2+	2+	2+	0	0	0	0
0,01/1000	0,500	3+	3+	3+	2+	0	0	0	0
0,01/1000	2	4+	4+	3+	0	0	0	0	0
témoin GRNS	0								

4) - CONCLUSION :

Le chlorure de chrome utilisé à une concentration de 1 p.1000 rend les suspensions globulaires autoagglutinables. D'autre part, la limite de sensibilité correspond à une dilution au 1/8000 du sérum, limite obtenue lorsque l'on incube directement l'antigène avec les hématies formolées sans agent de fixation. Dans les limites de notre expérimentation, cette technique au chlorure de chrome ne semble présenter aucun intérêt particulier pour la fixation de l'IgG sur des globules formolés.

IV - METHODE UTILISANT LE GLUTARALDEHYDE.

1) - PRINCIPE :

LING en 1961, utilisa le premier le glutaraldéhyde comme agent stabilisant des globules rouges (27), il signala en outre, que les globules rouges ainsi traités étaient capables de fixer des protéines en solution sans l'aide d'un autre agent de fixation. Ce phénomène fut observé de même par BENG, WEYAND et STAVISKY en 1967 (4). L'utilisation du glutaraldéhyde comme agent de fixation fut repris par ONKELINX en 1968 (36) puis par AVRAMEAS en 1969 (1). Ces différents travaux furent réalisés à l'aide de globules rouges frais. Notre travail personnel utilise des globules rouges formolés, nous verrons les divers avantages que cette technique présente.

2) - TECHNIQUE :

Elle est identique à la technique standard. La manipulation est effectuée à la température du Laboratoire.

3) - ETUDE DES PRINCIPAUX PARAMETRES :

Le glutaraldéhyde est utilisé à 16 p.1000, 4 p.1000 et 1 p.1000, l'IgG à 0,125 p.1000, 0,50 p.1000 et 2 p.1000.

Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau suivant :

Dilution de l'immunsérum anti IgG		1/8000	16000	32000	64000	128000	256000	512000	témoin G.R.S.
Glut. p.1000	IgG p.1000								
16	0,125	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
16	0,500	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
16	2,00	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
4	0,125	4+	4+	4+	4+	4+	+	0	0
4	0,500	4+	4+	4+	4+	4+	+	0	0
4	2,00	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0
1	0,125	4+	4+	2+	0	0	0	0	0
1	0,500	4+	4+	4+	+	0	0	0	0
1	2,00	4+	4+	4+	2+	0	0	0	0
témoin G.R.N.S.		0							

4) - CONCLUSION :

La concentration de glutaraldéhyde à 16 p.1000 nous donne des suspensions autoagglutinables. Nous voyons que la sensibilité décroît régulièrement avec la concentration en glutaraldéhyde. Les sensibilités obtenues sont bien supérieures à celles données par la B. B. D. et le chlorure de chrome.

L'utilisation de l'IgG à 0,5 p.1000 et de glutaraldéhyde à 1 p.1000 semble réaliser un bon compromis entre la sensibilité et la stabilité de la suspension.

V - ETUDE QUANTITATIVE DE LA FIXATION D'ANTIGENE MARQUE AU RADIO-ELEMENT - COMPARAISON DES TROIS TECHNIQUES.

1) - PRINCIPE :

Le marquage est réalisé selon la technique décrite préalablement. Le radioélément utilisé est l'iode 125. Il se prête parfaitement au type de manipulation que nous avons à effectuer. Sa période de 60 jours permet de l'utiliser dans la journée sans avoir à faire de corrections dues à la décroissance radioactive.

C'est un émetteur γ pur dont l'énergie est de 35,2 Kev.

2) - MANIPULATION :

Le détecteur utilisé pour le comptage est un cristal puits suivi d'un photo-multiplicateur. L'électronique est constituée par un spectroscope Laben modèle 100. Il permet d'avoir le spectre d'émission du radioélément et d'intégrer directement la courbe obtenue ; cette dernière est visualisée sur un tube cathodique. Ce modèle 100 canaux permet de compter exactement les coups correspondants à la zone d'énergie du radioélément étudié. Cette possibilité est particulièrement intéressante lorsque l'on travaille avec deux radioéléments d'énergie différente, ce qui est le cas pour l'iode 125 et l'iode 131. Le temps de comptage est affiché sur une horloge électronique en secondes. Les réglages utilisés pour le comptage de l'iode 125 sont les suivants :

T.H.T. - 800 V.

Amplification (gain) : 0,8 x 200.

Comptage sur 60 secondes.

Canaux 4 -12 pour l'iode 125.

Chaque séance de comptage est précédée de la détermination du bruit de fond. (b d f). Le nombre de coups obtenus permet d'une part d'exclure toute contamination du puits, d'autre part ce b d f doit être retiré de tout comptage. Il est en général bas, de l'ordre de 30 coups par minutes pour la zone d'énergie choisie. L'optimum de comptage de l'appareil se situe autour de 20.000 coups par minute. Tout comptage supérieur devra être corrigé ; ceci est fonction du temps mort de l'appareil. Lorsqu'un tube est placé dans le compteur puits, il faut tenir compte de la géométrie de l'échantillon par rapport au détecteur. Pour ne pas avoir à faire de corrections relativement complexes, nous utilisons un modèle unique de tube contenant toujours un volume identique.

- Schéma d'une manipulation :

- détermination de b d f
- le tube, contenant le culot globulaire, l'IgG marqué et l'agent de fixation, est passé dans le compteur ; soit n, le nombre de coups par minute totalisé par l'électronique : $n - (b d f) = 100 \%$.
- Après la sensibilisation et les trois lavages, le culot de globules rouges sensibilisés est repris dans un volume identique à celui du premier comptage (géométrie).
Soit x, le nombre de coups par minute obtenu.
x à (b d f) nous donne l'activité de l'iode 125 qui est resté fixé sur les globules. Le pourcentage d'iode fixé, c'est à dire le pourcentage d'IgG fixé est :

$$\frac{x - b d f}{n - b d f} \times 100$$

Il est donc possible, compte tenu de la quantité initiale d'IgG mise dans le tube de calculer la quantité d'IgG fixée sur les globules rouges formolés.

De plus, sachant le nombre de globules rouges présents il est possible de calculer le nombre moyen de molécules réelles d'IgG fixées par globules rouges.

Exemple de calcul :

Soit 500 mg d'IgG initialement mis dans le tube.

8 % le taux de fixation, cela correspond à
40 μ g d'IgG fixés.

Si l'on a opéré avec 1 ml de globules rouges à 10 % (hématocrite) nous avons $1,3 \times 10^9$ globules.

Nous pouvons écrire :

$150.000 \text{ g d'IgG} = 15 \times 10^{10} \mu\text{g d'IgG} = 6 \times 10^{23} \text{ molécules.}$

$\frac{40 \mu\text{g} \times 6 \times 10^{23}}{15 \times 10^{10}} = \frac{16 \times 10^{13}}{\text{cules d'IgG dans } 40 \mu\text{g d'IgG.}}$

Le nombre de molécules d'IgG par globule rouge est :

$\frac{16 \times 10^{13}}{1,3 \times 10^9} = 12,3 \times 10^4$

Ce calcul représente l'avantage de donner directement le nombre de molécules fixées sans avoir à préciser les concentrations de globules rouges ou d'antigène utilisés.

3) - TABLEAU COMPARATIF DES QUANTITES D'IgG FIXEES EN FONCTION
DE LA TECHNIQUE UTILISEE

Sensibilisation			Quantité d'IgG fixée			Dilution limite de l'immunsérum encore active
IgG Agent de fixation			p.100	g	<u>molécules</u> globules	
p.100	p.1000					
0,5	glut	1	10,5	52	159×10^3	1/64 000
0,250		1	10,5	26	80×10^3	1/64 000
0,125		1	9,25	11,5	35×10^3	1/32 000
0,5		10	12	60	184×10^3	auto-agglu- tination
0,5		1	9,3	46	141×10^3	1/64 000
0,5	Cl3Cr	0,1	6,5	32,5	100×10^3	1/8 000
0,250		0,1	8,1	20,3	62×10^3	1/8 000
0,125		0,1	12,2	15,2	47×10^3	1/8 000
0,5		0,1	6,2	31	95×10^3	1/8 000
0,5		1	14,6	73	224×10^3	auto-agglu- tination
0,5		0,01	6,6	33	101×10^3	1/8 000
0,5	BBD	1/30	8,2	41	126×10^3	1/8 000
0,250		1/30	14,1	35	107×10^3	1/16 000
0,125		1/30	12,8	16	49×10^3	1/16 000
0,5		1/30	7,5	38	117×10^3	1/8 000
0,5		1/60	7,2	36	111×10^3	1/8 000
0,5	témoin					
	sans fixant		7,4	37	114×10^3	1/8 000

4) - CONCLUSION :

L'étude de ces résultats nous montre la supériorité de la technique utilisant le glutaraldéhyde. En effet, pour une même quantité d'antigène fixée, la sensibilité donnée par cette technique est de 4 à 8 fois supérieure à celle donnée par les deux autres techniques. Cette qualité, alliée à la commodité de la mise en oeuvre de la sensibilisation en fait une méthode particulièrement intéressante.

ETUDE COMPLEMENTAIRE DES DIFFERENTS PARAMETRES INTERVENANT
DANS LA TECHNIQUE AU GLUTARALDEHYDE.

Dans cette deuxième partie, nous étudierons plus en détail les nombreux facteurs intervenant dans la fixation au glutaraldéhyde. De façon à pouvoir comparer les résultats, nous utilisons le même antigène (IgG humaine) ainsi qu'un protocole opératoire identique à celui décrit dans la technique standard, seul le paramètre étudié varie.

Nous envisageons successivement :

- L'influence de différents facteurs sur la sensibilité des suspensions globulaires,
- L'influence de la concentration globulaire au moment de la sensibilisation,
- L'influence de la concentration en glutaraldéhyde et en IgG de l'incubation sur la quantité d'IgG fixée,
- Le rôle du temps d'incubation,
- Le rôle de la température d'incubation,
- Le rôle du pH,
- L'analyse des eaux de lavage du culot globulaire;
- La sensibilisation successive sur un même lot de globules,
- La fixation de différentes sortes d'antigènes : albumine, IgA, IgM, chaînes Kappa et Lambda d'origine humaine, IgG de lapin,
- La fixation simultanée de plusieurs antigènes,
- La sensibilité limite pour la détection d'anticorps.

- INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LA SENSIBILITE DES SUSPENSIONS GLOBULAIRES.

Malgré notre effort de standardisation des différents éléments intervenant dans les processus de sensibilisation, il faut noter une certaine variabilité dépendant du lot de globules rouges formolés.

En effet, s'il est simple de standardiser les paramètres tels : le temps, la température, le pH, la concentration ionique, les concentrations en antigènes, en agent de fixation, en globules rouges, etc ..., il est un élément qui est responsable d'une certaine variabilité, c'est : la qualité propre de la suspension de globules rouges formolés.

En effet, la formolisation de globules rouges est fonction d'un certain nombre de variable que sont : la provenance, la température de formolisation, le temps d'incubation la vitesse de rotation lors du mélange des globules avec le formol, etc ...

De plus, chaque lot de globules rouges formolés subit dans le temps une transformation qui tend à le rendre autoagglutinable. Nous avons dit précédemment que chaque expérience introduisant un élément de comparaison, était fait sur un même lot de globules rouges et dans des délais ne permettant pas de modification dans la sensibilité du lot étudié. Il faut cependant signaler que certaines différences existent d'un lot à l'autre bien que les paramètres principaux soient identiques. Ainsi, une sensibilisation faite dans les conditions standards avec de l'IgG à 0,5 p.1000 et du glutaraldéhyde à 1 p.1000 peut nous donner avec des globules rouges formolés neufs une agglutination allant jusqu'au 1/16 000ème, une sensibilisation faite avec le même lot conservé 1 mois au réfrigérateur pourra nous donner une agglutination finale au 1/64 000ème.

En conclusion, l'expérience nous montre une très faible variabilité parmi les lots fraîchement formolés, au maximum une dilution de différence. Par contre, un même lot, dans le temps, voit sa sensibilité augmenter.

Ce phénomène à priori peu sécurisant, n'est cependant pas trop gênant. Toutes les expériences faites avec des lots plus ou moins récents et faisant intervenir des éléments comparatifs ont montré que les variations obtenues étaient toujours transposables quelles que soient les limites de sensibilité obtenues.

De plus, et dans le cas du glutaraldéhyde, la limite de sensibilité est directement proportionnelle à la quantité d'agent de fixation utilisée. Ainsi, il est toujours possible de modifier la limite de sensibilité en modifiant la concentration en glutaraldéhyde.

II - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION GLOBULAIRE AU MOMENT DE LA SENSIBILISATION.

A l'inverse de ce que nous avons fait jusqu'à présent, nous travaillons dans cette expérience avec des quantités de globules, d'IgG et de glutaraldéhyde constantes, mais sous des volumes différents.

Les résultats obtenus sont reproduits dans le tableau suivant : le glutaraldéhyde est ajouté à 4 p.1000 sous un volume de 1 ml.

Globules formolés à 100 %	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
IgG	0,1 ml à 2,5 p.1000	0,25 ml à 1 p.1000	0,5 ml à 0,5 p.1000	1 ml à 0,25 p.1000	2,5 ml à 0,1 p.1000
Dilution de l'immunsérum anti IgG :					
1/1000	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +
1/2000	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +
1/4000	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +
1/8000	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +
1/16000	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +
1/32000	4 +	4 +	4 +	4 +	0
1/64000	4 +	4 +	4 +	0	0
1/128000	4 +	4 +	0	0	0
1/256000	4 +	0	0	0	0
1/512000	+	0	0	0	0
Témoins GRS	+	0	0	0	0
Concentration des GR pendant la sensibilisation en %	7,7	6,2	4,8	3,2	1,6

CONCLUSION :

La concentration globulaire nous paraissant la meilleure est celle obtenue à l'aide de la technique standard 0,1 ml de globules rouges formolés à 10 %, 1 ml de glutaraldéhyde, 1 ml d'IgG. Si une concentration globulaire plus forte donne une meilleure sensibilité, en contre partie, elle apporte un risque d'autoagglutination.

III - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN GLUTARALDEHYDE ET EN IgG LORS DE L'INCUBATION SUR LA QUANTITE D'IgG FIXEE.

Nous étudions dans ce chapitre l'aspect quantitatif de la fixation d'IgG à la surface des globules rouges formolés en fonction des quantités d'IgG et de glutaraldéhyde présentées pendant l'incubation.

La technique utilisée est la technique standard.

RESULTATS :

IgG p.1000	Glut. p.1000	Quantité d'IgG fixée			Dilution limite de l'immunsérum encore active
		p.100	g	molécules globules	
0,5	16	30,8	154	473 000	autoagglutination
0,5	4	15,1	74,8	229 000	1/128 000
0,5	1	10,4	52	159 000	1/32 000
0,5	0	8	40	123 000	1/8 000
0,125	1	11,1	13,8	42 000	1/16 000
0,5	1	9,6	48	147 000	1/32 000
2	1	5,2	104	319 000	1/32 000

CONCLUSION :

Nous constatons le rôle important du glutaraldéhyde sur la quantité d'IgG fixée, ainsi que son rôle sur la sensibilité des solutions obtenues. Le glutaraldéhyde, comme nous l'avions déjà noté préalablement, règle principalement la quantité d'antigène fixée, mais aussi la qualité de cette fixation. En effet, si nous comparons les résultats obtenus dans la quatrième colonne avec ceux des colonnes 6 et 5, nous voyons que pour des quantités d'IgG fixées sensiblement égales ou même moindres, les dilutions limites d'agglutination sont supérieures en présence de glutaraldéhyde à celles obtenues par adsorption simple sans agent de fixation. Cette expérience montre le double rôle, qualitatif et quantitatif que joue le glutaraldéhyde dans la fixation d'antigène à la surface de globules rouges formolés.

IV - ROLE DU TEMPS D'INCUBATION.

La technique utilisée est la technique standard, seul le temps d'incubation varie.

Le glutaraldéhyde est utilisé à 4 p.1000 et à 1.p.1000.

RESULTATS :

Temps d'incubation	60 mn		30 mn		15 mn		5 mn		0 mn	
Glut. p.1000	4	1	4	1	4	1	4	1	4	1
Dilution de l'immunsérum anti IgG										
1/1000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+
1/2000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1/4000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1/8000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1/16000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+
1/32000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	0
1/64000	4+	3+	4+	3+	4+	0	2+	0	0	0
1/128000	3+	0	3+	0	0	0	0	0	0	0
1/256000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/512000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
témoin GRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CONCLUSION :

Une incubation de 15 minutes semble suffisante. Le léger gain de sensibilité obtenu avec une incubation de 30mn et une heure ne semble pas particulièrement intéressant eu égard à la perte de temps que cela présente

Les résultats obtenus à l'aide des suspensions sensibilisées avec 4 et 1 p.1000 de glutaraldéhyde sont superposables compte-tenu de leurs différences de sensibilité propre à la concentration en glutaraldéhyde.

- ROLE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION.

Technique standard, seule la température d'incubation varie. Tous les réactifs sont pré-incubés à la température désirée.

Glutaraldéhyde à 1 p.1000.

Dilution de l'immunsérum anti IgG	Température d'incubation		
	4°	22°	37°
1/1000	4 +	4 +	4 +
1/2000	4 +	4 +	4 +
1/4000	4 +	4 +	4 +
1/8000	4 +	4 +	4 +
1/16000	3 +	4 +	4 +
1/32000	0	2 +	4 +
1/64000	0	0	2 +
1/128000	0	0	0
1/256000	0	0	0
Témoin GRS	0	0	0

CONCLUSION :

Il faut noter une augmentation de la sensibilité en fonction de l'élévation de la température d'incubation.

VI - ROLE DU pH.

Les différents pH étudiés sont réalisés à l'aide de tampon phosphate 0,01 M ClNa 0,14 M. Les dilutions d'IgG, de glutaraldéhyde ainsi que la suspension de globules rouges formolés sont effectuées dans chaque tampon étudié.

L'IgG est utilisée à 0,5 p.1000, le glutaraldéhyde à 1 p.1000.

La technique utilisée est la technique standard.

RESULTATS :

Dilution de l'immunsérum anti IgG	pH		
	6	7	8
1/1000	4 +	4 +	4 +
1/2000	4 +	4 +	4 +
1/4000	4 +	4 +	4 +
1/8000	4 +	4 +	4 +
1/16000	4 +	4 +	4 +
1/32000	4 +	4 +	4 +
1/64000	3 +	+	2 +
1/128000	2 +	0	2 +
1/256000	2 +	0	2 +
1/512000	2 +	0	2 +
témoin GRS	2 +	0	+

CONCLUSION :

Seule la sensibilisation à pH 7 donne des résultats corrects. Les sensibilisations à Ph 6 et 8 donnent des suspensions autoagglutinables. Il est toutefois assez difficile d'interpréter le rôle du pH dans la sensibilisation, étant donné la variation de la concentration ionique d'un tampon à l'autre. Le calcul de la concentration ionique est difficile à réaliser compte-tenu de l'influence du pH sur la dissociation des ions phosphates.

VII - ANALYSE DES EAUX DE LAVAGE DU CULOT GLOBULAIRE.

Nous avons vu préalablement que le pourcentage d'IgG radioactive fixée dans les conditions standards de la technique avec de l'IgG à 0,5 p.1000 et du glutaraldéhyde à 1 p.1000 était de l'ordre de 10 %. Le surnageant de sensibilisation contenant à peu près 90 % de l'IgG, il importe de savoir si les trois lavages effectués réussissent à débarrasser le culot globulaire de cet excès d'antigène non fixé. Nous avons étudié le surnageant des trois lavages par inhibition de l'hémagglutination et par comptage de l'activité résiduelle en nous servant pour la sensibilisation d'IgG marquée à l'iode 125.

1) - Par inhibition de l'hémagglutination :

La technique d'inhibition de l'hémagglutination utilisée est celle décrite dans la dernière partie de notre travail. L'immunsérum est dilué de façon à avoir 4 doses minimales hémagglutinantes dans 0,2 ml.

RESULTATS :

IgG à 0,5 p.1000	Dilutions									
	1/10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
Servant de témoin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Surnageant du mélange d'incubation	0	0	0	0	0	0	0	0	+	2 +
1ère eau de lavage	0	0	+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4 +
2ème eau de lavage	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
3ème eau de lavage	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4 +

CONCLUSION :

Il est impossible après 3 lavages de déceler par inhibition de l'hémagglutination toute trace d'IgG ayant servi à la sensibilisation. La différence d'une dilution entre l'inhibition avec l'IgG à 0,5 p.1000 et le surnageant d'incubation correspond à la dilution au demi de l'IgG par le glutaraldéhyde lors de la sensibilisation.

2) - Activité résiduelle des surnageants de lavage après sensibilisation avec de l'IgG marquée à l'iode 125 :

Activité de surnageant	Pourcentage d'activité
Initiale	100 %
1ère eau de lavage	1 %
2ème eau de lavage	0,16%
3ème eau de lavage	0,03%

CONCLUSION :

Ces résultats confirment parfaitement ceux obtenus par l'inhibition de l'hémagglutination pour le 1er lavage (baisse de 99 %). Les trois lavages semblent donc suffisants pour débarrasser les globules rouges de l'IgG non fixée, puisque l'activité résiduelle n'est plus qu'environ 1/3000ème de l'activité initiale.

3) - Essais de sensibilisation avec le surnageant d'incubation.

Etant donnée la présence résiduelle de 90 % de l'IgG dans le surnageant d'incubation, nous avons essayé d'utiliser ce surnageant pour sensibiliser d'autres globules rouges formolés. Ne sachant pas la quantité résiduelle de glutaraldéhyde nous avons fait deux expériences:

- une sensibilisation directe avec le surnageant,
- une sensibilisation avec le surnageant mais après addition de 0,1 ml de glutaraldéhyde à 10 p.1000.

Chaque surnageant de sensibilisation est repris pour faire une deuxième sensibilisation, ceci 4 fois de suite.

Résultats :

a) avec sensibilisation directe :

Dilution de l'immunsérum anti IgG	1er lot	2ème lot	3ème lot	4ème lot
1/250	4 +	+	0	0
1/500	4 +	+	0	0
1/1000	4 +	+	0	0
1/2000	4 +	+	0	0
1/4000	4 +	2 +	+	0
1/8000	4 +	3 +	+	(+)
1/16000	4 +	3 +	+	(+)
1/32000	4 +	2 +	+	(+)
1/64000	0	+	+	0
1/128000	0	0	0	0
1/256000	0	0	0	0
témoin	0	0	0	0

b) - Avec addition de glutaraldéhyde :

Dilution de l'immunsérum anti IgG	1er lot	2ème lot	3ème lot	4ème lot
1/250	4 +	+	0	0
1/500	4 +	+	0	0
1/1000	4 +	2 +	0	0
1/2000	4 +	2 +	+	0
1/4000	4 +	3 +	+	+
1/8000	4 +	4 +	2 +	+
1/16000	4 +	4 +	2 +	+
1/32000	4 +	2 +	+	+
1/64000	+	+	0	0
1/128000	0	0	0	0
1/256000	0	0	0	0
témoin GRNS	0	0	0	0

L'inhibition de l'hémagglutination réalisée avec le surnageant du 4ème lot et dans les mêmes conditions que précédemment nous donne un taux de 1/512. Ce qui correspond à peu près à 10 % de la quantité d'IgG utilisée pour la sensibilisation du 1er lot.

CONCLUSION :

Il semble possible de réutiliser le surnageant d'incubation pour faire une deuxième sensibilisation, toutefois les résultats sont moins nets et l'on voit apparaître un phénomène de zone.

Les différences obtenues avec et sans glutaraldéhyde, semblent indiquer que l'épuisement en glutaraldéhyde et en IgG évolue parallèlement.

VIII - SENSIBILISATION SUCCESSIVE SUR un MEME LOT DE GLOBULES.

Afin d'étudier une éventuelle saturation des globules rouges formolés par l'antigène, nous avons fait 4 sensibilisations successives sur deux lots de globules rouges formolés. Le 1er lot étant sensibilisé par simple adsorption, le 2ème à l'aide de glutaraldéhyde.

MANIPULATION :

La technique utilisée est la technique standard. Après le 3ème lavage le culot globulaire est repris par l'IgG et l'agent de fixation comme pour une sensibilisation normale et ainsi de suite.

L'IgG utilisée est marquée par l'iode 125.

Le glutaraldéhyde est pris sur les culots globulaires après le 3ème lavage.

RESULTATS :

- 1) - Lot sensibilisé par simple adsorption. Le glutaraldéhyde est remplacé par un volume égal de tampon.

Sensibilisations	Quantité d'IgG fixée			Quantité d'IgG ajoutée µg
	%	µg	molécules globules	
1ère sensibilisation	5,8	29	89000	17,6 16,4 15,2
2ème sensibilisation	9,3	46,6	143000	
3ème sensibilisation	12,6	63	193000	
4ème sensibilisation	15,7	78,2	240000	

- 2) - Lot sensibilisé à l'aide de glutaraldéhyde à 1 p.1000

Sensibilisations	Quantité d'IgG fixée			Quantité d'IgG ajoutée µg
	%	µg	molécules globules	
1ère sensibilisation	7,1	35,2	108000	26,2 35,6 33,4
2ème sensibilisation	12,3	61,4	188000	
3ème sensibilisation	19,4	97,0	298000	
4ème sensibilisation	26,1	130,4	400000	

Le titrage par hémagglutination à l'aide d'un immunosérum anti IgG nous donne : limite d'agglutination au 1/8000 pour le lot sensibilisé quatre fois par simple adsorption ; au 1/128000 pour le lot sensibilisé quatre fois sur le glutaraldéhyde à 1 p.1000.

CONCLUSION :

Les sensibilisations successives ne semblent pas saturer les globules rouges formolés, ceci dans les limites de l'expérience.

Il faut noter la grande sensibilité du lot préparé avec le glutaraldéhyde par rapport au lot préparé par simple adsorption, ce qui confirme le rôle essentiel du glutaraldéhyde.

IX - FIXATION D'ANTIGENES DIFFERENTS.

Après l'étude des différents paramètres intervenant dans la sensibilisation au glutaraldéhyde avec de l'IgG humain nous étudions la fixation d'antigènes différents : IgA, IgM, chaînes lambda, albumine d'origine humaine et IgG de lapin.

A - PROVENANCE DE CES DIFFERENTS ANTIGENES :

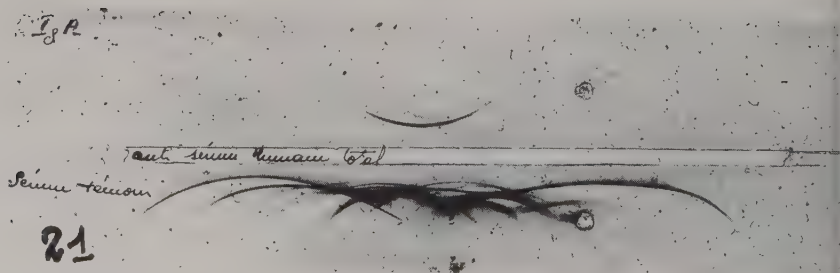
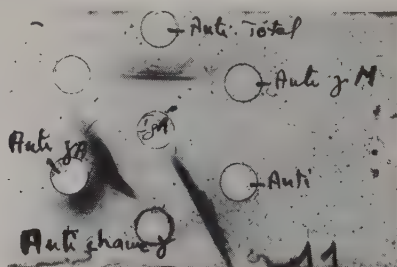
L'IgA a été préparée dans le Laboratoire de Monsieur PILLOT à l'Institut Pasteur par Madame d'AZANDUJA, que nous remercions ici pour sa collaboration technique.

Le schéma de fractionnement est le suivant :

- Précipitation par l'éthanol,
- Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose,
- Précipitation par le sulfate de zinc.

La fraction IgA donne selon la méthode d'OUCHTERLONY, le schéma suivant :

La ligne de précipitation obtenue entre l'immunsérum anti γ et l'autre α 2 M vient du fait de l'épuisement de ce dernier par des IgG lors de sa préparation



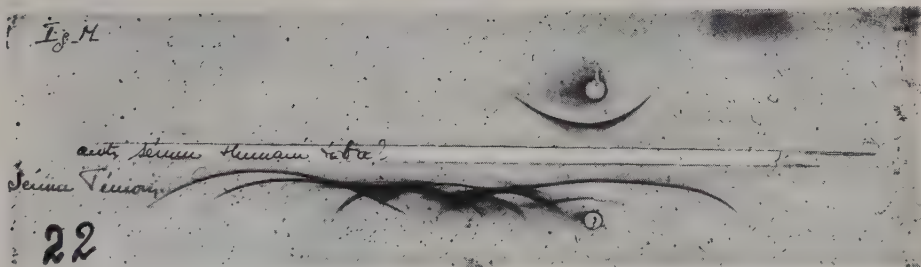
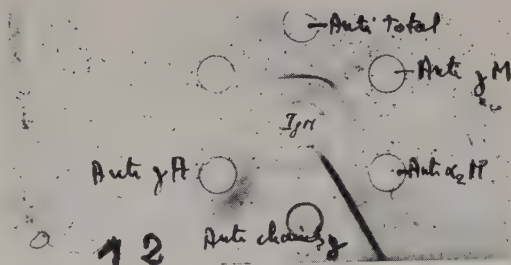
Analyse immunoélectrophorétique réalisée à l'aide d'un immunsérum anti sérum humain total.

Il faut noter la présence en petite quantité de transferrine.

L'IgM :

Nous avons utilisé une IgM préparée dans notre Laboratoire, selon la technique décrite précédemment. Le contrôle de pureté selon la méthode d'OUCHTERLONY nous a donné les résultats suivants :

Analyse de l'IgM par diffusion double. Il faut noter la présence de trace d'IgG.



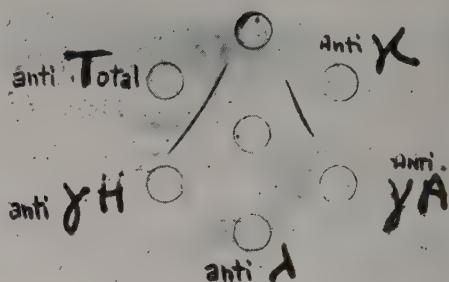
L'analyse immunoélectrophorétique de l'IgM réalisée à l'aide d'un immunosérum anti sérum humain total.

Les chaînes lambda nous ont été données par Madame DANON du Centre HAYEM de l'Hôpital Saint-Louis de PARIS.

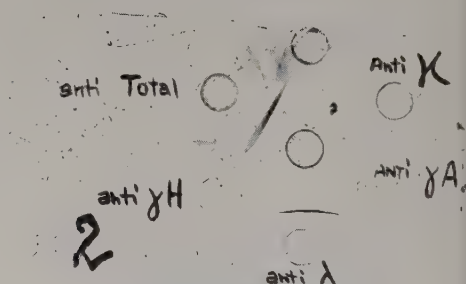
Les chaînes Kappa ont été préparées selon la technique décrite au début de notre travail.

Les contrôles de pureté donnent les résultats suivants :

Analyse des chaînes Kappa par diffusion double, les immunosérums sont placés dans les trous périphériques.

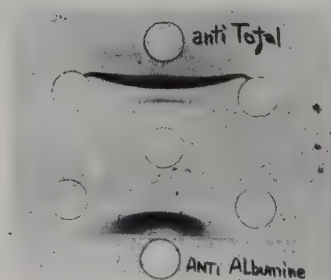


Analyse des chaînes lambda par diffusion double.



L'albumine nous a été fournie par le Centre National de Transfusion Sanguine. Le contrôle de pureté nous donne les résultats suivants :

Analyse de l'albumine par diffusion double.



Les IgG de lapin ont été préparées dans notre Laboratoire à l'aide de la technique que nous avons décrite précédemment.

Contrôle de pureté :

IgG de lapin

I. S. anti lapin total

5

Analyse immunoélectrophorétique de l'IgG de lapin à l'aide d'un immunosérum anti lapin total.

B - PROVENANCE DES IMMUNSERUMS CORRESPONDANTS.

Les immunosérums anti IgG, A et M sont ceux produits et commercialisés par l'Institut Pasteur.

Les immunosérums anti-albumine ont été préparés selon la technique décrite au début de notre travail.

Nous avons aussi utilisé des immunosérums anti-albumine produits par les Laboratoires HYLAND et BEHRING-WERKE.

Les immunosérums anti chaînes Kappa et Lambda nous ayant donné les meilleurs résultats sont ceux fournis par le Centre de Transfusion Sanguine de ROUEN.

Les immunosérums anti chaînes lourdes proviennent également du Centre de Transfusion Sanguine de ROUEN.

Les immunosérums anti-IgG de lapin ont été préparés dans le Laboratoire de Monsieur PILLOT à l'Institut Pasteur.

1) - Fixation d'IgA humaine :

Les concentrations minimales permettant une sensibilisation sont plus élevées que celles utilisées pour l'IgG.

L'utilisation d'IgA à 0,5 mg/ml donne une agglutination visible mais incomplète quelle que soit la concentration en glutaraldéhyde.

L'IgA à 1 mg/ml donne de très bons résultats, l'étude des rapports entre la concentration en IgA et la concentration en glutaraldéhyde nous donne des variations superposables à celles obtenues avec l'IgG.

RESULTATS :

IgA p.1000	0,5	1	2	0,5	1	2
Glut. p.1000	1	1	1	4	4	4
Dilution de l'immunsérum anti IgA						
1/250	+	3+	3+	2+	4+	4+
1/500	+	3+	4+	2+	4+	4+
1/1000	2+	3+	4+	3+	4+	4+
1/2000	+	3+	4+	+	4+	4+
1/4000	0	+	2	0	2+	4+
1/8000	0	0	0	0	0	+
1/16000	0	0	0	0	0	0
1/32000	0	0	0	0	0	0
Témoin G.R.S.	0	0	0	0	0	0

CONCLUSION :

Compte-tenu des résultats identiques obtenus avec du glutaraldéhyde à 1 p.1000, de l'IgA à 2 p.1000 et du glutaraldéhyde à 4 p.1000, de l'IgA à 1.p.1000, nous préférons utiliser ces dernières dilutions eu égard à la quantité plus faible d'IgA.

2) - Fixation d'IgM :

L'IgM se fixe sur les globules rouges formolés à des concentrations sensiblement identiques à celles de l'IgG.

L'étude des sensibilités avec de l'IgM à 0,125 p. 1000, 0,5 p.1000 et 2 p.1000 et du glutaraldéhyde à 1 et 4 p.1000 sont résumés dans le tableau suivant :

IgM p.1000	0,125	0,5	2	0,125	0,5	2
Glut. p.1000	1	1	1	4	4	4
Dilution de l'immunsérum anti IgM						
1/250	2+	4+	4+	3+	4+	4+
1/500	2+	4+	4+	3+	4+	4+
1/1000	2+	4+	4+	3+	4+	4+
1/2000	+	4+	4+	3+	4+	4+
1/4000	+	4+	4+	2+	4+	4+
1/8000	0	+	4+	+	4+	4+
1/16000	0	0	+	+	4+	4+
1/32000	0	0	0	0	2+	3+
1/64000	0	0	0	0	0	2+
1/128000	0	0	0	0	0	2+
témoin G.R.S.	0	0	0	0	0	2+

CONCLUSION :

Il existe des risques d'autoagglutination avec l'IgM à 2 p.1000 et le glutaraldéhyde à 4 p.1000. Les suspensions de globules rouges sensibilisées à l'IgM sont moins stables que celles obtenues à l'aide des autres immunoglobulines. Plusieurs essais de sensibilisation à l'aide d'IgM préalablement traitées au β mercaptoéthanol ne donnent pas ces risques d'autoagglutination. Cela confirme l'aptitude qu'ont les IgM à former des agglutinats naturellement.

3) - Sensibilisation à l'aide de chaînes légères type kappa et lambda :

Les concentrations nécessaires pour obtenir une sensibilisation sont plus élevées lorsqu'il s'agit de chaînes légères que pour l'immunoglobuline entière.

Les essais réalisés avec des chaînes kappa ou lambda prises à 0,5 et 2 p.1000 et du glutaraldéhyde à 1 et 4 p.1000 donnent les résultats suivants :

Chaînes kappa p.1000	0,5	2	0,5	2
Glut. p.1000	1	1	4	4
Dilution de l'immunsérum anti-kappa				
1/125	+	3+	2+	4+
1/250	+	4+	2+	4+
1/500	2+	4+	3+	4+
1/1000	2+	4+	3+	4+
1/2000	+	4+	3+	4+
1/4000	0	2+	2+	4+
1/8000	0	0	+	4+
1/16000	0	0	0	2+
1/32000	0	0	0	0
témoin G.R.S.	0	0	0	0

CONCLUSION :

Les concentrations inférieures à 2 p.1000 en chaînes légères donnent un phénomène de zone par excès d'anticorps relativement important, de plus l'agglutination n'est pas totale.

4) - Sensibilisation à l'aide d'albumine humaine :

L'albumine humaine est utilisée à 0,5 à 2 p.1000.

Le glutaraldéhyde à 1 et 4 p.1000.

Les résultats sont les suivants :

Albumine p.1000	0,5	2	0,5	2
Glut. p.1000	1	1	4	4
Dilution de l'immunsérum anti-albumine				
1/125	4+	4+	4+	4+
1/250	4+	4+	4+	4+
1/500	3+	4+	4+	4+
1/1000	+	4+	3+	4+
1/2000	0	3+	+	4+
1/4000	0	+	0	3+
1/8000	0	0	0	+
1/16000	0	0	0	0
1/32000	0	0	0	0
Témoin G.R.S.	0	0	0	0

CONCLUSION :

Ces résultats sont obtenus avec un sérum produit par les Laboratoires HYLAND.

Les titres obtenus à l'aide de sérums anti-albumine préparés dans notre Laboratoire sont 16 à 32 fois plus élevés.

Le procédé d'immunisation que nous avons utilisé est celui décrit dans le chapitre réservé aux techniques.

La fixation d'albumine humaine sur des globules rouges formolés en présence de glutaraldéhyde ne présente aucun problème particulier. Les concentrations nous paraissant les meilleures sont : albumine 2 p.1000, glutaraldéhyde 1 p.1000.

5) - Fixation d'IgG de lapin :

La sensibilisation par les IgG de lapin donne des résultats parfaitement superposables à ceux obtenus à l'aide de l'IgG humaine ; les concentrations minimales utilisables sont du même ordre (0,125 p.1000).

X - FIXATION SIMULTANEE DE PLUSIEURS ANTIGENES.

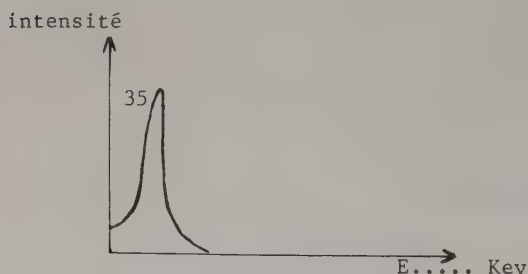
1) - Antigène de poids moléculaire identique, mais de spécificité différente :

Pour cette expérience, nous avons utilisé de l'I humaine marquée à l'iode 125 et de l'IgG de lapin marquée à l'iode 131.

La manipulation est réalisée en deux temps ; la sensibilisation est d'abord faite avec chaque IgG séparément, puis avec un mélange des deux.

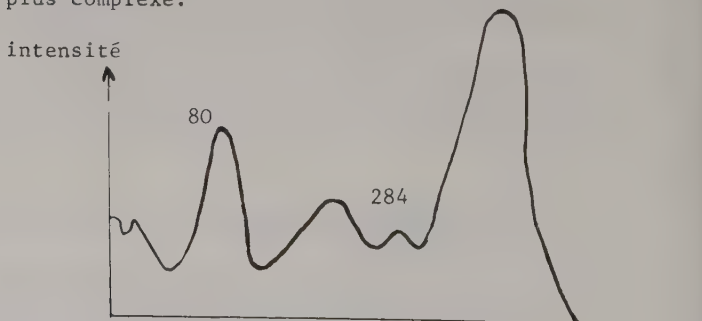
Le comptage de l'activité radioisotopique est réalisé comme nous l'avons indiqué plus haut, toutefois, dans la deuxième expérience, la présence simultanée de deux radioisotopes ayant des activités différentes nous oblige à faire certaines corrections.

L'iode 125 ainsi que nous l'avons déjà noté est émetteur γ pur de 35 Kev.



Spectrogramme de désintégration de l'iode 125.

L'iode 131 possède un diagramme de désintégration plus complexe.



Spectrogramme de désintégration de l'iode 131

Les comptages de l'iode 131 sont réalisés sur le pic situé à 364 Kev ; les comptages de l'iode 125 sont faits sur le pic situé à 35 Kev, la superposition des deux spectrogrammes nous montre qu'une partie de l'activité de l'iode 131 se situe à 35 Kev c'est à dire au niveau du pic d'émission de l'iode 125. Il convient donc d'apporter un facteur de correction au comptage de l'iode 125 lorsqu'il est réalisé en présence d'iode 131.

En utilisant l'appareil LABEN dont les caractéristiques et les réglages ont été précédemment donnés, nous avons trouvé qu'environ 10 % de l'activité de l'iode 131 (canaux 84-99) se retrouvent dans la zone de comptage du 125 (canaux 4 - 12).

Lors du comptage de l'iode 125 en présence d'iode 131, nous enlevons donc à l'activité mesurée en 125, 10 % de l'activité mesurée en 131.

Les quantités d'IgG humaine et de lapin, fixées séparément ou conjointement sont données dans les tableaux suivants.

Les IgG sont utilisées à une concentration de 1 p. 1000

Le glutaraldéhyde est utilisé à une concentration de 1P.1000.

Tableau de fixation d'IgG humaine, marquée à l'iode 125.

IgG à 1 p.1000	1 ml	0,8	0,6	0,4	0,2
Tampon	0	0,2	0,4	0,6	0,8ml
Quantité d'IgG fixée %	7,8	8,4	10,9	13,9	14
µg	78	67	65	55,5	28
Agglutination limite à l'aide de sérum anti IgG	1/32000	32000	16000	16000	16000

Tableau de fixation d'IgG de lapin marquée à l'iode 131.

IgG à 1 p.1000	1 ml	0,8	0,6	0,4	0,2
Tampon	0	0,2	0,4	0,6	0,8 ml
Quantité d'IgG fixée %	5,8	5,2	6,3	7,3	9,4
µg	58	41,5	37,8	29,2	18,8
Agglutination limite à l'aide de sérum anti-albumine au	1/2000	2000	2000	2000	2000

Tableau de fixation simultanée d'IgG humaine et d'IgG de lapin

IgG humaine	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml
IgG lapin	0,8	0,6	0,4	0,2
Quantité d'IgG fixée IgG humaine %	12,8	8,9	7,9	7,3
µg	25,6	35,6	47,4	58,4
IgG lapin %	5,2	6,5	6,3	6,9
µg	41,6	39	25,2	13,8
Quantité totale d'IgG fixée	67,2	74,6	72,6	65,3
Agglutination limite Sérum anti IgG humaine	1/16000	1/16000	1/16000	1/16000
Sérum anti IgG lapin	1/1000	1/2000	1/2000	1/2000

CONCLUSION :

L'étude des chiffres obtenus ne permet pas de mettre en évidence une compétition dans la fixation des deux immunoglobulines à la surface des globules.

L'IgG de lapin semble se fixer moins bien sur les globules que l'IgG humaine.

Dans la fixation simultanée des deux immunoglobulines G, la quantité totale de protéines est de 1 p.1000, la moyenne de la quantité fixée se situe aux environs de 70 μ g, ce qui représente à peu près la moyenne réalisée entre la fixation d'IgG humaine à 1 p.1000 seule (78 μ g) et l'IgG de lapin à 1 p.1000 seule (58 μ g).

2) - Fixation d'antigènes de poids moléculaires différents :

Cette expérience est réalisée à l'aide d'IgG humaine marquée à l'iode 125 et d'albumine humaine marquée à l'iode 131. Les problèmes de comptages sont identiques à ceux de l'expérience précédente. Chaque essai est réalisé en double. L'IgG humaine est utilisée à une concentration de 0,5 p.1000, l'albumine à 1 p.1000, le glutaraldéhyde à 1 p.1000.

Dans les tubes concernant le mélange, les concentrations en IgG et albumine sont deux fois plus fortes sous des volumes deux fois moindres afin d'opérer à volume constant.

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

IgG	1 ml à 0,5 p.1000	1 ml à 0,5 p.1000	0	0	0,5 ml à 1 p.1000	0,5 ml à 1 p.1000
Albumine	0	0	1 ml à 1 p.1000	1 ml à 1 p.1000	0,5 ml à 2 p.1000	0,5 ml à 2 p.1000
Pourcentage de fixation						
IgG	8,27	8,37	0	0	3,12	3,25
Albumine	0	0	2,85	2,37	1,57	1,86

Le pourcentage d'IgG fixée avec le mélange par rapport à la fixation d'IgG seule est de 38 si l'on fait la moyenne des deux expériences. Il est de 66 % pour l'albumine.

CONCLUSION :

Il semble résulter de ces chiffres que l'albumine se fixe plus facilement à la surface des globules que l'IgG. Ne connaissant pas le mécanisme exact de fixation au niveau des globules, il est difficile d'établir un lien entre la fixation et le poids moléculaire.

3) - Fixation de plusieurs antigènes simultanément :

a) - Sensibilisation à l'aide d'un mélange d'IgA, d'IgG et d'IgM.

Dans cette expérience, nous mélangeons de l'IgA, de l'IgG et de l'IgM de façon à ce que leur concentration finale respective soit : 1 p.1000, 0,5 p.1000 et 0,5 p.1000, ce qui correspond à leur optimum respectif de sensibilisation.

Le glutaraldéhyde est utilisé à une concentration de 2 p.1000 à cause de la concentration à 1 p.1000 de l'IgA.

Le titrage est effectué à l'aide de différents immunsérums :

- immunsérum anti α
- immunsérum anti μ
- immunsérum anti γ
- immunsérum anti kappa
- immunsérum anti lambda

RESULTATS :

Dilution des Immunsérums	Immunserums anti				
	α	μ	γ	kappa	lambda
1/1000	4+	4+	4+	4+	4+
1/2000	4+	4+	4+	4+	4+
1/4000	4+	4+	4+	4+	4+
1/8000	2+	4+	4+	4+	4+
1/16000	0	4+	2+	4+	2+
1/32000	0	3+	0	2+	0
1/64000	0	0	0	0	0
1/128000	0	0	0	0	0
1/256000	0	0	0	0	0
1/512000	0	0	0	0	0
témoin G.R.S.	0	0	0	0	0

CONCLUSION :

Ces résultats montrent la possibilité de fixer plusieurs antigènes à la surface des globules sans que cela nuise

à la spécificité ou à la sensibilité des agglutinations.

Nous verrons l'intérêt de ces sensibilisations avec plusieurs antigènes lors de l'utilisation de l'inhibition de l'hé-magglutination comme technique de dosage. Il faut noter en outre, que les limites d'agglutination avec les immunsérums anti-kappa et lambda sont supérieures à celles obtenues avec des globules rouges sensibilisés par l'antigène seul.

D'autre part, nous avons remarqué que dans d'autres expériences du même type, les quantités minimales d'antigène nécessaires à la fixation sont abaissées.

b) - Sensibilisation à l'aide d'un sérum humain total :

Dans cette expérience nous avons essayé de sensibiliser des globules rouges formolés à l'aide de dilution différentes d'un sérum humain total normal.

Le sérum est dilué au 1/10, 1/30, 1/75.

Le glutaraldéhyde est utilisé à la concentration de 4 p.1000.

Le titrage est effectué à l'aide d'immunsérum anti IgG, IgA et IgM.

RESULTATS :

Dilution de l'immunsérum anti IgG	Dilution du sérum humain		
	1/10	1/30	1/75
1/1000	4+	4+	4+
1/2000	4+	4+	4+
1/4000	4+	4+	4+
1/8000	4+	4+	4+
1/16000	4+	4+	4+
1/32000	4+	4+	2+
1/64000	4+	2+	0
1/128000	4+	0	0
1/256000	0	0	0
1/512000	0	0	0
Témoin G.R.S.	0	0	0

Dilution de l'immunsérum anti IgA	Dilution du sérum humain		
	1/10	1/30	1/75
1/125	3+	0	0
1/250	3+	0	0
1/500	3+	0	0
1/1000	3+	0	0
1/2000	2+	0	0
1/4000	+	0	0
1/8000	0	0	0
1/16000	0	0	0
témoin G.R.S.	0	0	0

Dilution de l'immunsérum anti IgM	Dilution du sérum humain		
	1/10	1/30	1/75
1/125	4+	2+	0
1/250	4+	2+	0
1/500	4+	2+	0
1/1000	4+	+	0
1/2000	2+	0	0
1/4000	+	0	0
1/8000	+	0	0
1/16000	0	0	0
Témoin G.R.S.	0	0	0

CONCLUSION :

Compte-tenu de la dilution du sérum au 1/10, les concentrations moyennes en immunoglobulines sont de l'ordre de:

IgG		1,3 mg/ml
IgA		0,4 mg/ml
IgM		0,1 mg/ml

Les concentrations en IgA et en IgM sont à la limite inférieure minimale pouvant se fixer.

Cette expérience montre en outre, que la fixation de protéine en faible quantité peut être réalisée malgré l'importance et la diversité des antigènes présents dans le milieu d'incubation.

XI - SENSIBILITE LIMITE POUR LA DETECTION D'ANTICORPS.

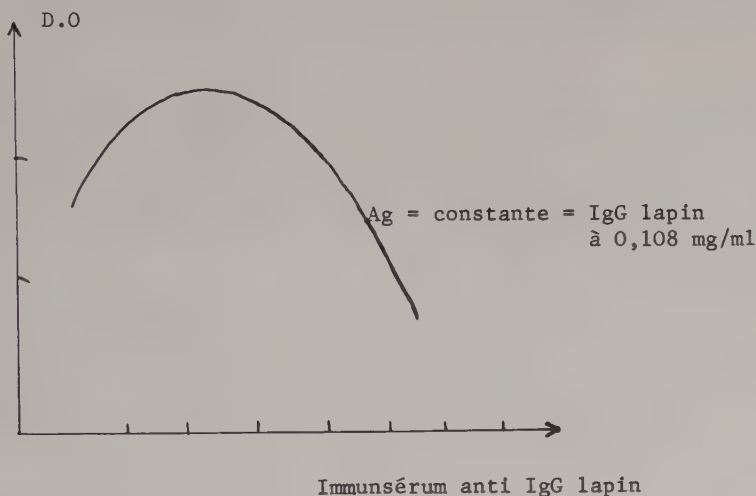
Le système utilisé pour cette expérience est le suivant :

IgG de lapin à 0,5 p.1000

Glutaraldéhyde à 1 p;1000.

L'agglutination est faite à l'aide d'un immunosérum de chèvre anti IgG de lapin. L'établissement d'une courbe de précipitation avec ce système antigène anticorps nous a montré que l'immunsérum contient 1 mg/ml d'anticorps anti IgG de lapin. La dilution limite de l'immunsérum encore agglutinant est de 1/10 000, soit 0,1 μ g/ml. L'agglutination étant réalisée avec 0,2 ml d'immunsérum, la quantité minimale d'anticorps décelée est de 0,02 μ g, ce qui correspond à 0,0032 μ g exprimé en azote anticorps.

Cette limite de sensibilité peut encore être reculée si l'on augmente la quantité de glutaraldéhyde lors de la sensibilisation, toutefois cette augmentation de sensibilité se fait au détriment de la stabilité des suspensions.



Courbe de précipitation d'IgG lapin par un sérum anti IgG lapin.

ESSAIS D'EXPLICATION DU PHENOMENE DE FIXATION

I - HYPOTHESES.

La première conception de la fixation d'un antigène à la surface des globules rouges formolés en présence de glutaraldéhyde consiste à imaginer le rôle de l'agent de fixation comme étant celui d'un pont reliant la membrane globulaire à l'antigène, ceci à l'image du rôle de la B.B.D.

Cependant, les travaux de JONIAU (24), d'AVRAMEAS (2) (3) sur la formation de complexes protéiques par traitement au glutaraldéhyde, posent la question de savoir si le glutaraldéhyde favorise préférentiellement la fixation des antigènes sur les globules ou bien leur polymérisation. Il est vraisemblable que les deux mécanismes soient imbriqués.

Un phénomène semble paradoxal : l'augmentation de la concentration en glutaraldéhyde augmente la sensibilité des suspensions des globules rouges sensibilisés. En effet, nous avons contrôlé par l'utilisation de radioisotopes que la quantité d'antigène fixée à la surface des globules rouges augmente en fonction de la quantité de glutaraldéhyde utilisée.

Dans ce cas, nous devrions avoir au contraire une baisse de la sensibilité car si l'on admet que l'agglutination limite est donnée par un certain rapport entre les anticorps et les globules sensibilisés, plus ces derniers sont riches en antigène plus la consommation en anticorps est grande ce qui doit aboutir à faire baisser le rapport anticorps utiles à l'agglutination sur anticorps fixés ne jouant aucun rôle dans l'agglutination.

Ce phénomène est d'ailleurs observé pour les sensibilisations à la B.B.D. où l'on voit une baisse de la sensibilité lorsque l'on augmente la concentration en antigène. De même, nous pouvons citer le cas du Pneumocoque qui, très riche en antigènes de surface, n'agglutine qu'avec des concentrations relativement fortes d'antisérum.

De plus, nous avons vu dans les expériences précédentes que pour une même quantité d'antigène fixée à la surface des globules, la sensibilité est bien supérieure si la fixation est réalisée à l'aide du glutaraldéhyde plutôt que par simple adsorption.

Il semble donc vraisemblable que le glutaraldéhyde dispose stériquement les antigènes à la surface des globules de manière à faciliter la création de ponts d'agglutination par les anticorps.

Afin d'essayer de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons réalisé différentes manipulations où nous essayons de faire dans un premier temps des agrégats d'antigène par le glutaraldéhyde ou par la chaleur ; agrégats que nous fixons ensuite sur les globules par simple adsorption ou à l'aide de glutaraldéhyde.

II - FIXATION D'AGREGAT FORMES PAR LE GLUTARALDEHYDE.

L'antigène utilisé est de l'IgG humaine à 1 p.1000.
Le glutaraldéhyde est utilisé à 4, 2 et 1 p.1000.

Le processus opératoire est le suivant :

- incubation 15 minutes de l'IgG avec le glutaraldéhyde.
- Dialyse 48 heures contre le tampon phosphate physiologique pour enlever le glutaraldéhyde en excès.
- Sensibilisation avec et sans glutaraldéhyde selon la technique standard.

RESULTATS :

Dilution du Glutaral- déhyde servant à la polymérisation	1/1000	1/2000	4/1000	1/1000	2/1000	4/1000
Dilution de l'IgG	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000	1/1000
Dilution du Glutaral- déhyde servant à la sensibilisation	1/1000	1/1000	1/1000	0	0	0
Tampon	0	0	0	1/1000	1/1000	1/1000
Dilution de l'immun- sérum anti IgG						
1/1000	2+	+	+	0	+	+
1/2000	2+	+	+	+	+	+
1/4000	3+	2+	2+	2+	+	+
1/8000	3+	2+	+	2+	2+	+
1/16000	2+	+	0	0	0	0
1/32000	+	+	0	0	0	0
1/64000	0	0	0	0	0	0
1/128000	0	0	0	0	0	0
Témoin G.R.S.	0	0	0	0	0	0

CONCLUSION :

Les agglutinations sont incomplètes. Il semble cependant qu'il y ait une meilleure sensibilité en utilisant le glutaraldéhyde lors de la sensibilisation. Cette expérience ne permet ni d'affirmer ni d'infirmer l'hypothèse selon laquelle le glutaraldéhyde forme des agrégats d'antigènes avant de se fixer.

III - FIXATION D'AGREGATS FORMES PAR L'ACTION DE LA CHALEUR.

Le processus opératoire est le suivant :

- incubation à différentes températures d'une solution d'IgG humaine pendant 15 minutes,
- la solution est ensuite utilisée pour sensibiliser les globules rouges formolés en présence du glutaraldéhyde selon la technique standard.

Plusieurs essais préalables nous ont montré qu'il existe une augmentation de la sensibilité pour les zones de températures situées entre 60° et 75°, une température supérieure amène une dénaturation de l'antigène, ce dernier devient incapable de réagir avec l'immunsérum correspondant.

Ces essais ont été faits avec des antigènes marqués à l'iode 125 afin d'en déterminer la quantité fixée sur les globules.

L'IgG est utilisée à une concentration de 0,5 p. 1000.

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Température servant à l'agrégation	65°	70°	75°	25°	65°	70°	75°	25°
Glutaraldéhyde servant à la sensibilisation p.1000	1	1	1	1	0	0	0	0
Quantité d'IgG fixée p.1000	9,7	17,2	59,5	8,6	11,1	15,2	68	7,5
Dilution de l'immunsérum anti IgG								
1/1000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1/2000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1/4000	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1/8000	4+	4+	4+	4+	2+	4+	3+	0
1/16000	4+	4+	4+	4+	0	2+	0	0
1/32000	4+	4+	3+	2+	0	0	0	0
1/64000	+	4+	0	0	0	0	0	0
1/128000	0	0	0	0	0	0	0	0
1/256000	0	0	0	0	0	0	0	0
témoin G.R.S.	0	0	0	0	0	0	0	0

CONCLUSIONS :

Il résulte de ce tableau que le glutaraldéhyde joue un rôle primordial dans la fixation de l'antigène au niveau du globule rouge formolé. Nous voyons en outre, que les agrégats formés par la chaleur joue un rôle important dans la sensibilisation, rôle mis en évidence après sensibilisation avec ou sans glutaraldéhyde.

Les pourcentages importants d'antigène retrouvés dans les tubes correspondant aux agrégations réalisées à 75° doivent être considérées avec circonspection ; en effet, les agrégats réalisés à cette température sont de taille relativement importante, ils sédimentent vraisemblablement aux vitesses de centrifugation utilisées pour la sensibilisation et le lavage des globules. Toutefois, la quantité non fixée ne doit pas être très importante car leur rôle inhibiteur sur l'immunsérum n'est pas détecté lors du titrage.

ETUDE DE L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Après avoir étudié les différents paramètres régissant les modalités de fixation d'un antigène à la surface de globules rouges formés, en présence de glutaraldéhyde, nous allons envisager l'utilité que présente la technique d'inhibition de l'hémagglutination comme méthode de dosage des antigènes.

Cette méthode consiste à mettre en présence des dilutions de l'antigène à doser avec une dose hémagglutinante de l'immunsérum ; dans un deuxième temps les globules rouges sensibilisés par l'antigène sont ajoutés. L'inhibition maximum correspond au dernier tube où la sédimentation des globules est complète.

Dans un premier chapitre nous étudions les différentes modalités techniques de mise en oeuvre de la méthode, l'aspect quantitatif, la limite de sensibilité ainsi que sa reproductibilité.

Nous envisageons ensuite quelques applications de la technique

- Dosage des immunoglobulines dans le sérum de 33 sujets atteints de dysglobulinémie, les résultats sont comparés à ceux obtenus par la technique de MANCINI.
- Dosage des immunoglobulines dans 5 liquides céphalorachidiens.
- Dosage des immunoglobulines dans différents liquides biologiques : urines, salive, colostrum, etc ...

I - ETUDE DE DIFFERENTS PARAMETRES INTERVENANT DANS LA TECHNIQUE D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION.

1) - Description de la technique standard :

Le titrage du pouvoir hémagglutinant de l'immunsérum à l'égard de la suspension de globules rouges sensibilisés est réalisé selon la technique d'agglutination décrite dans les chapitres précédents. La dose limite d'immunsérum donnant une hémagglutination totale correspond à la dose minimale hémagglutinante (D M H).

Le schéma standard de la technique d'inhibition est le suivant :

- Mise en présence des dilutions successives de l'antigène avec plusieurs D M H.
- Homogénéisation suivie d'une incubation de 15 minutes.
- Addition de globules rouges sensibilisés.
- Homogénéisation.
- Lecture après 1 H.30 .

2) - Rôle du volume des différentes solutions utilisées.

Afin de simplifier les manipulations, il est préférable d'opérer avec des volumes identiques d'immunsérum, d'antigène et de globules rouges. Pour le titrage, les volumes utilisés sont de 0,2 ml : 0,2 ml de l'immunsérum, 0,2 ml de tampon, 0,2 ml de la suspension de globules rouges sensibilisés. Le volume de tampon est remplacé dans l'inhibition par les dilutions de l'antigène à doser, afin d'opérer dans les deux cas à volume constant.

Plusieurs essais réalisés avec des volumes d'immunsérum et d'antigènes différents ne nous ont pas permis d'améliorer la sensibilité de la réaction.

pour des commodités de standardisations et compte-tenu du matériel employé, nous utilisons le schéma suivant

- 0,2 ml des dilutions de l'antigènes.
- 0,2 ml de l'immunsérum.
- 0,2 de G.R.S.

3) - Rôle de la concentration de l'immunsérum.

Nous avons défini plus haut la dose minimale hémagglutinante (D M H) comme étant la concentration la plus faible en immunsérum donnant une hémagglutination totale.

Afin d'étudier l'influence de la concentration de l'immunsérum sur le dosage par inhibition d'un antigène, nous utilisons pour un même antigène 4, 3, 2 et 1 D.M.H. de l'immunsérum.

La manipulation est réalisée à l'aide de globules rouges sensibilisés par de l'IgG à 0,5 p.1000 et du glutaraldéhyde à 1 p.1000. Le titrage donne une agglutination limite pour une dilution au 1/16000.

L'inhibition est donc faite en présence d'un immunsérum au :

1/16000	=	1 D.M.H.
1/8000	=	2 D.M.H.
1/5333	=	3 D.M.H.
1/4000	=	4 D.M.H.

L'incubation réalisée entre les dilutions de l'antigène et les D.M.H. d'immunsérum est de 15 minutes à la température du laboratoire.

Les globules rouges sensibilisés sont utilisés à 2 % comme pour le titrage.

RESULTATS :

Dilution de l'IgG à 0,5 p.1000	D M H			
	4	3	2	1
1/25	0	0	0	0
1/50	0	0	0	0
1/100	0	0	0	0
1/200	0	0	0	0
1/400	0	0	0	0
1/800	3+	+	0	0
1/1600	4+	4+	3+	0
1/3200	4+	4+	4+	2+
1/6400	4+	4+	4+	4+
1/12800	4+	4+	4+	4+

CONCLUSIONS :

Bien que la réaction soit une et deux fois plus sensible à l'aide de 2 et 1 D.M.H., nous préférons utiliser 4 D.M.H. afin d'avoir une marge de sécurité plus grande.

4) - Rôle du temps d'incubation.

Lors de la mise en présence des dilutions de l'antigène avec l'immunsérum, l'incubation correspond à la fixation des anticorps sur les antigènes. Le temps nécessaire à cette union est relativement court.

Nous n'avons pas trouvé de différence notable pour des temps d'incubation supérieures à 15 minutes.

5) - Influence de la sensibilisation des globules sur l'inhibition de l'hémagglutination.

A priori, seule la dilution de l'immunsérum et la concentration de l'antigène à doser peuvent avoir un rôle sur la limite de l'inhibition.

Nous avons fait 4 lots de globules sensibilisés par différentes concentrations en Glutaraldéhyde.

L'IgG est utilisé à 0,5 p.1000.

Le glutaraldéhyde est à 10 p.1000, 5 p.1000, 1 p.1000 et 0,5 p.1000.

La technique de sensibilisation est la technique standard, les résultats obtenus sont les suivants :

Lot n°	1	2	3	4
Glutaraldéhyde p.1000	10	5	1	0,5
IgG p.1000	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution de l'immunsé- rum anti IgG.				
1/1000	4+	4+	4+	4+
1/2000	4+	4+	4+	4+
1/4000	4+	4+	4+	4+
1/8000	4+	4+	4+	4+
1/16000	4+	4+	4+	4+
1/32000	4+	4+	2+	2+
1/64000	4+	3+	0	0
1/128000	3+	2+	0	0
1/256000	+	0	0	0
1/512000	+	0	0	0
témoin G.R.S.	0	0	0	0

Chacun de ces quatre lots de globules rouges sensibilisés a été utilisé pour effectuer quatre réactions d'inhibition à l'aide d'un même antigène et de l'immunsérum dilué de façon à obtenir un même nombre de D.M.H., correspondant à la sensibilité de chaque lot globulaire.

L'antigène utilisé pour l'inhibition est de l'IgG à 0,5 p.1000
L'immunsérum est celui ayant servi au titrage.

RESULTATS :

Lots n°	1	2	3	4
Dilution de l'immun- sérum correspondant 1/32000 à 4 D.M.H.		1/16000	1/8000	1/8000
Dilution de l'IgG à 0,5 p.1000				
1/50	0	0	0	0
1/100	0	0	0	0
1/200	0	0	0	0
1/400	0	0	0	0
1/800	0	0	0	0
1/1600	+	2+	3+	3+
1/3200	3+	4+	4+	4+
1/6400	4+	4+	4+	4+
1/12800	4+	4+	4+	4+
1/25600	4+	4+	4+	4+

CONCLUSIONS :

Nous pouvons constater que, compte-tenu du calcul des D.M.H., les résultats de l'inhibition sont absolument identiques, quelle que soit la concentration du glutaraldéhyde utilisé lors de la sensibilisation.

La méthode de sensibilisation des suspensions globulaires ne semble pas avoir d'influence sur les résultats du dosage par inhibition.

6) - Inhibition réalisée à l'aide de globules sensibilisés par plusieurs antigènes.

L'étude de plusieurs sérums par inhibition de l'hémagglutination a été réalisée à l'aide de différents lots de globules rouges.

Nous avons utilisé d'une part, des suspensions de globules sensibilisés simultanément par les 3 antigènes : IgG, IgA et IgM ; d'autre part, des suspensions sensibilisées séparément par chaque antigène.

Titration des suspensions :

Lot n° 1 correspondant à la sensibilisation simultanée :

Dilution de l'immun-sérum anti	δ	α	μ
1/1000	4+	4+	4+
1/2000	4+	4+	4+
1/4000	4+	4+	4+
1/8000	+	3+	4+
1/16000	0	0	4+
1/32000	0	0	3+
1/64000	0	0	0
1/128000	0	0	0

Lots correspondants aux sensibilisations séparées.

Lots n°	2	3	4
Dilution de l'immun-sérum anti	γ	α	μ
1/1000	4+	4+	4+
1/2000	4+	4+	4+
1/4000	3+	3+	4+
1/8000	0	+	4+
1/16000	0	0	+
1/32000	0	0	0
1/64000	0	0	0
1/128000	0	0	0

Dosage par inhibition des immunoglobulines de plusieurs sérums humains :

Cette étude a été réalisée à l'aide de 13 sérums différents. Nous ne reproduisons ici que les tableaux correspondants à deux d'entre eux ; les résultats obtenus pouvant être transposés à l'ensemble.

Inhibition à l'aide de la suspension n° 1 :

Dilution de l'immun-sérum n° 1	4 D.M.H. d'immunserum anti		
	γ	α	μ
1/500	0	0	0
1/1000	0	0	0
1/2000	0	0	2+
1/4000	0	0	4+
1/8000	0	0	4+
1/16000	0	+	4+
1/32000	3+	4+	4+
1/64000	4+	4+	4+

Dilution du Sérum n° 2	4 D.M.H. d'immunsérum anti		
	γ	α	μ
1/500	0	0	0
1/1000	0	0	2+
1/2000	0	0	4+
1/4000	0	2+	4+
1/8000	0	4+	4+
1/16000	0	4+	4+
1/32000	0	4+	4+
1/64000	3+	4+	4+

Inhibition à l'aide des suspensions 2, 3 et 4.

Lots n°	2	3	4
4 D.M.H. d'immunsérum anti	γ	α	μ
<u>Dilution du sérum n° 1</u>			
1/500	0	0	0
1/1000	0	0	+
1/2000	0	0	4+
1/4000	0	0	4+
1/8000	0	0	4+
1/16000	2+	3+	4+
1/32000	4+	4+	4+
1/64000	4+	4+	4+
<u>Dilution du sérum n° 2</u>			
1/500	0	0	+
1/1000	0	0	3+
1/2000	0	+	4+
1/4000	0	4+	4+
1/8000	0	4+	4+
1/16000	0	4+	4+
1/32000	2+	4+	4+
1/64000	4+	4+	4+

CONCLUSION :

Nous voyons que les différences obtenues dépendent uniquement de la concentration de l'immunsérum donnant 4 D.M.H. Les différences d'une dilution en moyenne obtenue avec le même sérum mais en prenant soit la suspension 1, soit la suspension 2, 3, 4, dépendent uniquement du calcul des D.M.H. ; les 4 DMH utilisées dans le premier cas sont deux fois plus diluées que dans le deuxième cas.

Il faut noter que les résultats obtenus avec les deux sérums sont superposables, il en a été de même avec les autres sérums étudiés.

En conclusion, nous constatons que dans la réaction d'inhibition c'est l'immunsérum qui a le rôle primordial ; il convient que cet immunsérum soit parfaitement spécifique de l'antigène ; que cet antigène soit seul ou non à la surface des globules ne semble rien changer à la réaction.

L'avantage de la sensibilisation multiple réside dans le fait de n'avoir qu'un seul lot de globules sensibilisés pour effectuer l'inhibition.

L'inconvénient en est la consommation plus importante d'antigène, lors de la sensibilisation des globules.

7) - Etude comparée des résultats d'inhibition obtenus avec des lots de globules sensibilisés par la B.B.D., le Chlorure de chrome et le glutaraldéhyde.

Les sensibilisations sont effectuées selon la technique standard avec cependant les modalités propres à chaque agent de fixation ainsi que nous les avons définies dans les chapitres précédents.

- La Benzidine-bis-diazotée est diluée au 1/30.
- Le Chlorure de chrome est dilué au 0,1 p.1000.
- Le glutaraldéhyde est dilué à 1 p.1000.

L'antigène servant à la sensibilisation est de l'IgG humaine à 0,5 p.1000.

RESULTATS :

Agent de fixation Dilution de l'im- munsérum anti IgG	Glutaraldéhyde	Cl 3 Cr	B.B.D.
1/1000	4+	4+	4+
1/2000	4+	4+	4+
1/4000	4+	4+	4+
1/8000	4+	2+	4+
1/16000	4+	0	2+
1/32000	4+	0	0
1/64000	2+	0	0
1/128000	0	0	0
1/256000	0	0	0
1/512000	0	0	0
Témoin G.R.S.	0	0	0

L'inhibition est réalisée à l'aide de l'IgG ayant servi à la sensibilisation.

La dilution de l'immunsérum correspond à 4.D.M.H.

RESULTATS :

Dilution de l'IgG servant à l'inhi- bition à 0,5 p. 1000	Lots sensibilisés avec		
	Glutaraldéhyde	Cl 3 Cr	B.B.D.
1/50	0	0	0
1/100	0	0	0
1/200	0	2+	0
1/400	0	4+	2+
1/800	+	4+	4+
1/1600	3+	4+	4+
1/3200	4+	4+	4+
1/6400	4+	4+	4+
1/12800	4+	4+	4+
1/25600	4+	4+	4+

CONCLUSION :

Nous constatons que les différences observées dans l'inhibition correspondent exactement aux différences qui existent entre les dilutions de l'immunsérum contenant 4 D.M.H., c'est-à-dire, aux différences existant entre les dilutions de l'immunsérum servant au titrage des suspensions.

En effet, les 4 D.M.H. servant pour l'inhibition du lot sensibilisé par le glutaraldéhyde correspondent à des dilutions de l'immunsérum anti IgG, 8 fois plus fortes que celles du lot réalisé avec le chlorure de chrome, et 4 fois plus que celles du lot sensibilisé par la B.B.D.

8) - Précision de la méthode :

Afin d'étudier l'aspect quantitatif de la méthode, nous avons réalisé plusieurs inhibitions à l'aide d'un même antigène pris à des concentrations voisines.

Les globules rouges sont sensibilisés par de l'IgG humaine à 0,5 p.1000 à l'aide de glutaraldéhyde à 1 p.1000

L'IgG utilisée comme antigène est prise aux concentrations suivantes : 0,5 p.1000, 0,4 p.1000, 0,3 p.1000 et 0,2 p.1000. La dilution de l'immunsérum anti IgG contient 4 D.M.H.

RESULTATS :

IgG à Dilué au	0,5 p.1000	0,4 p.1000	0,3 p.1000	0,2 p.1000
1/25	0	0	0	0
1/50	0	0	0	0
1/100	0	0	0	0
1/200	0	0	0	0
1/400	0	0	0	0
1/800	0	0	0	0
1/1600	0	0	+	2+
1/3200	+	2+	4+	4+
1/6400	4+	4+	4+	4+
1/12800	4+	4+	4+	4+

CONCLUSION :

La différence d'une croix entre la lecture de l'inhibition à l'aide de l'IgG à 0,5 p.1000 et de l'IgG à 0,4 p.1000 ne permet pas, compte tenu des possibilités d'erreurs faites dans les dilutions, d'affirmer le résultat à 20 % près. Toutefois, lorsque la concentration de l'antigène passe du simple au double, l'inhibition augmente

de la même manière . Il semble donc raisonnable si l'on veut s'entourer d'une marge de sécurité suffisante de donner les résultats à 50 % près.

9) - Sensibilité de la méthode dans la détection d'antigène :

Nous venons de voir dans le chapitre précédent qu'une solution d'IgG à 0,5 p.1000 inhibe encore l'hémagglutination à une dilution de 1/5000, ce qui correspond à une concentration de 0,1 μ g/ml, soit 0,02 μ g réel, compte-tenu du volume de 0,2 ml avec lequel l'inhibition est réalisée.

Cela correspond à la sensibilité moyenne de la méthode, elle peut éventuellement être augmentée si on utilise des globules rouges sensibilisés par de fortes concentrations en glutaraldéhyde, ce qui augmente ainsi les dilutions limites hémagglutinantes (D.M.H.) de l'immunsérum.

10) - Influence des protéines non spécifiques :

Afin d'étudier le rôle éventuel des protéines non spécifiques sur l'inhibition par des protéines spécifiques nous avons réalisé plusieurs solutions contenant des quantités constantes d'IgG et des quantités croissantes de protéines de spécificités différentes.

- Solution 1 : IgG à 0,5 p.1000
- Solution 2 : IgG à 0,5 p.1000, albumine à 3 p.1000
- Solution 3 : IgG à 0,5 p.1000, albumine à 30 p.1000
- Solution 4 : IgG à 0,5 p.1000, sérum total de chèvre dilué au demi.

La suspension de globules rouges a été sensibilisée par l'IgG à 0,5 p.1000, du glutaraldéhyde à 2 p.1000.

L'inhibition est réalisée avec 4 D.M.H.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Dilution de la solution au	Solutions			
	1	2	3	4
1/100	0	0	0	0
1/200	0	0	0	0
1/400	0	0	0	0
1/800	0	0	0	0
1/1600	0	0	0	0
1/3200	+	+	+	+
1/6400	4+	4+	4+	4+
1/12800	4+	4+	4+	4+
1/25600	4+	4+	4+	4+

CONCLUSION :

La quantité et la qualité des protéines présentes dans la solution de l'antigène à doser n'influent pas sur la limite d'inhibition.

11)- Protocole opératoire de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.

Les procédés de sensibilisation et de titrage sont ceux décrits dans les chapitres précédents.

Pour effectuer une réaction d'inhibition de l'hémagglutination, il convient tout d'abord de vérifier la parfaite spécificité des immunosérums utilisés. Ceci peut être fait par la technique d'OUCHTERLONY ainsi que par inhibition de l'hémagglutination.

Lorsqu'il s'agit d'immunosérums anti-immunoglobulines ils doivent être spécifiques de chaînes lourdes afin de ne pas donner des réactions croisées avec les chaînes légères.

Les opérations sont faites de la manière suivante :

Dans une plaque à hémagglutination type O.M.S. on ajoute dans l'ordre :

- 0,2 ml de chacune des dilutions de demi en demi de la solution antigénique à doser.

- 0,2 ml d'une dilution de l'immunsérum spécifique contenant 4 doses minimales hémagglutinantes.

Homogénéiser, attendre 15 mn.

- 0,2 ml de la suspension de globules rouges sensibilisés par l'antigène.

Homogénéiser, lire après 1 h.30.

Plusieurs témoins sont réalisés conjointement :

Témoin de sédimentation des globules rouges sensibilisés :

- 0,2 ml de la dilution la moins forte de l'antigène.
- 0,2 ml de tampon.
- 0,2 ml de G.R.S.

Témoin d'agglutination de l'immunsérum :

La solution de l'immunsérum sera diluée de demi en demi dans une série de 4 Cupules de façon à obtenir : 4, 2, 1 et 1/2 D.M.H. sous un volume de 0,2 ml.

On ajoute 0,2 ml de tampon.

Attendre 15 mn.

0,2 ml de G.R.S.

La lecture est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment.

Ce témoin permet de vérifier la dilution de l'immunsérum.

II - APPLICATION DE LA TECHNIQUE D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION AU DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES DANS DIFFERENTS LIQUIDES BIOLO- GIQUES.

La diffusion radiale en milieu gélosé est la méthode la plus utilisée pour le dosage des immunoglobulines dans le sérum.

Parmi les très nombreux auteurs ayant abordé ce problème, il faut citer Mc KELVEY et FAHEY (30) pour leurs travaux sur les variations des immunoglobulines au cours des différentes maladies, SANDOR et AL (53) pour leur étude des différentes protéines chez les sujets normaux.

Il nous a semblé intéressant de comparer les résultats obtenus par inhibition de l'hémagglutination et par diffusion radiale à propos de 33 sérums dont l'analyse immunoélectrophorétique réalisée dans notre laboratoire a confirmé la présence de paraprotéines. Un travail analogue, mais réalisé sur les IgA et les IgG d'individus apparemment sains et ayant des baisses de ces fractions a été effectué en 1968 par JOHANSSON et AL (21).

Nous envisageons ensuite quelles possibilités offre cette méthode d'inhibition pour les dosages d'immunoglobulines dans différents liquides biologiques.

1) - Dosages comparatifs d'immunoglobulines par diffusion radiale et par inhibition de l'hémagglutination à propos de 33 dysglobulinémies.

Les techniques utilisées sont décrites dans les chapitres précédents.

Les résultats sont exprimés en dilution de l'inhibition pour l'inhibition de l'hémagglutination, en gramme par litre pour la diffusion radiale.

Les premiers résultats sont ceux donnés par un pool de sérums normaux servant ici de témoin.

RESULTATS :

Immunsérum anti 4 D.M.H.	γ	K	L	α	β	IgG	IgA	IgM
N° du Sérum :	Inhibition de l'hémagglutination dilution p.1000 du sérum inhibi- teur.					Difusion radiale en g/l		
Pool témoin	8	16	8	8	1	11	3	0,8
1	16	32	8	8	1	25	3	0,75
2	32	32	1	2	0,500	45	0,6	0,40
3	64	64	4	4	0,500	53	1,2	0,55
4	16	16	16	8	1	30	3,3	0,65
5	8	16	8	8	1	18	3	0,60
6	64	64	4	4	0,125	56	1	0,10
7	64	64	2	2	0,250	53	0,6	0,15
8	32	8	32	4	0,125	44	0,9	0,12
9	4	8	4	4	1	3,2	1,55	0,60
10	64	4	64	2	0,500	58	0,6	0,45
11	64	64	16	4	0,250	50	1,8	0,25
12	32	32	4	4	1	42	1,4	0,70
13	64	128	4	4	0,250	45	1,15	0,15
14	64	64	4	4	0,250	60	0,90	0,20
15	16	16	16	8	1	21	3,8	0,80
16	16	32	8	2	0,500	27	0,40	0,55
17	64	64	2	2	0,250	52	0,65	0,20
18	16	8	16	8	1	28	3,2	0,75
19	16	16	2	2	0,500	19	0,65	0,30
20	8	64	8	32	1	9,5	20	0,98
21	2	32	2	16	0,500	3	8	0,50
22	8	32	8	32	4	13	12	2
23	2	64	2	64	0,500	2	45	0,55
24	4	16	4	16	2	3,5	8	1,4
25	4	32	4	32	1	4,5	14	0,61
26	4	8	32	32	2	4,6	16	1
27	4	64	4	32	0,125	6	14	0,11
28	4	64	4	16	1	5,5	10,5	0,67
29	1	128	1	64	0,500	1,15	35	0,5

30	2	4	128	128	1	2,2	60	0,70
31	4	128	8	128	2	5	55	1,2
32	4	64	4	8	32	5	4,6	31
33	4	32	4	8	32	6,5	4	27,5

Les sérums numérotés de 1 à 9 contiennent des paraprotéines de type IgG, de 20 à 31 de type IgA, 32 et 33 de type IgM.

CONCLUSION :

L'étude de ce tableau amène un certain nombre de remarques. Tout d'abord, les dilutions limites d'inhibition obtenues avec le pool de sérum témoin et les immunsérums anti γ et α sont égales bien que la concentration réelle en immunoglobulines déterminée par diffusion radiale soient notablement différents, 2 et 3 g/l. Ne connaissant pas la concentration réelle en anticorps des immunsérums anti γ et α , il est impossible d'envisager une correspondance entre la dilution de l'immunsérum contenant 4 D.M.H., la dilution limite d'inhibition du sérum inhibiteur et sa concentration en antigène dosé. Il est nécessaire d'opérer par rapport à un sérum témoin pris comme étalon. C'est pourquoi nous avons choisi dans cette expérience un pool de sérums humains normaux, chacun ayant été vérifié par analyse immunoélectrophorétique.

L'étude de la variation des concentrations en paraprotéines nous montre une correspondance assez nette entre la technique d'inhibition et le dosage par diffusion radiale, la limite d'inhibition double parallèlement à l'augmentation de la concentration réelle en paraprotéines. Les 19 paraprotéines de type IgG nous donnent des variations limites allant de 0,3 à 6 fois la concentration normale. La moyenne se situe à 3,9.

Les 12 paraprotéines de type IgA présentent des concentrations limites allant de 3 à 20 fois la concentration normale ; la moyenne étant de 25.

Les 2 paraprotéines de type IgM ne permettant pas une étude statistique, les concentrations que nous avons trouvées sont de 30 à 35 fois plus élevées que la concentration normale.

L'aspect semi quantitatif de la technique d'inhibition de l'hémagglutination ne peut remplacer la technique par diffusion radiale, cette dernière autorisant une précision bien supérieure. Cependant, plusieurs avantages notables peuvent, dans un certain nombre de cas, faire préférer la technique d'inhibition : principalement, la facilité de mise en oeuvre ainsi que l'obtention rapide des résultats.

De plus, dans les augmentations importantes en antigène, ce qui est le cas le plus fréquent lors des dysglobulinémies, l'inhibition de l'héماغglutination malgré la relative imprécision de son aspect quantitatif permettra aisément le diagnostic. Il faut noter aussi la possibilité d'identifier rapidement le type de la chaîne légère impliquée dans la paraprotéine.

En dernier lieu, cette technique permettra, dans le cas où il est nécessaire de connaître exactement la concentration en paraprotéine, de déterminer la dilution à utiliser pour effectuer le dosage par diffusion radiale.

2) - Dosage par inhibition de l'hémagglutination d'Immunoglobulines dans différents liquides biologiques.

A - DANS LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN.

Nous avons utilisé 5 liquides céphalorachidiens différents présentant des concentrations protéiques différentes.

Le protocole opératoire utilisé est celui décrit précédemment.

Les chiffres donnés correspondent aux dilutions limites inhibitrices du L.C.R.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Immunsérum anti		γ	α	μ
N° du L.C.R.	Protéinorachie	Dilution limite d'inhibition		
1	0,52 g/l	1/256	1/32	1/2
2	0,45 g/l	1/256	1/32	1/1
3	2,10 g/l	1/1024	1/256	1/8
4	0,42 g/l	1/256	1/32	1/1
5	0,25 g/l	1/128	1/16	0

Il faut noter l'augmentation parallèle de la protéinorachie et de la limite d'inhibition. Dans le L.C.R. n° 5 provenant d'un individu normal, il faut noter l'absence d'IgM.

B - DANS L'URINE NORMALE.

Cette étude a été réalisée à l'aide de plusieurs urines normales dont la concentration moyenne en protéine se situe aux environs de 0,020 g/l. Les résultats obtenus par inhibition étant identiques pour ces différents échantillons, nous ne reproduisons qu'un seul tableau.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Dilution de l'urine :	4 D.M.H. de l'immunsérum anti		
	γ	α	μ
1/1	0	0	4+
1/2	0	0	4+
1/4	0	0	4+
1/8	0	+	4+
1/16	0	4+	4+
1/32	+	4+	4+
1/64	4+	4+	4+
1/128	4+	4+	4+

L'absence de détection d'IgM dans l'urine normale est à noter. Le filtre glomérulaire ne laissant passer que les protéines de faible poids moléculaire, la recherche de protéine de poids moléculaire élevé présente un intérêt particulier. La technique d'inhibition de l'hémagglutination peut être dans ce cas un auxiliaire utile pour le diagnostic et la classification des protéinuries.

C - DANS LA SALIVE.

Les résultats obtenus à l'aide d'une salive d'individu normal sont les suivants :

Dilution de la salive :	4 D.M.H. de l'immunsérum anti		
	γ	α	μ
1/10	0	0	0
1/20	0	0	0
1/40	0	0	4+
1/80	+	0	4+
1/160	4+	2+	4+
1/320	4+	4+	4+

Il faut noter la concentration plus élevée en IgA qu'en IgG. Ceci est habituel dans les liquides de sécrétion.

D - DANS LE COLOSTRUM.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Dilution de colostrum :	4 D.M.H. de l'immunsérum anti		
	γ	α	μ
1/125	0	0	0
1/250	0	0	0
1/500	0	0	+
1/1000	0	0	4+
1/2000	2+	0	4+
1/4000	4+	4+	4+
1/8000	4+	4+	4+

Ainsi que pour la salive, la concentration en IgA est supérieure à la concentration en IgG.

E - DANS LE LIQUIDE SEMINAL

Les résultats obtenus sont les suivants :

Dilution du liquide séminal	4 D.M.H. de l'immunsérum anti		
	γ	α	μ
1/10	0	0	0
1/20	0	0	0
1/40	0	0	2+
1/80	0	4+	4+
1/160	+	4+	4+
1/320	4+	4+	4+
1/640	4+	4+	4+

CONCLUSIONS :

Ces quelques exemples montrent les possibilités qu'offre la technique d'inhibition pour effectuer des dosages semi-quantitatifs des différents liquides biologiques. Son intérêt réside principalement dans la rapidité de sa mise en oeuvre, sa grande sensibilité ainsi que la faible quantité d'échantillons utilisés. Ces différents points sont repris plus en détail dans la discussion.

DISCUSSION :

Les problèmes que nous avons rencontrés au cours de ce travail sont relativement nombreux. Plusieurs étapes peuvent arbitrairement être distinguées. En premier lieu, nous allons envisager la fixation de l'antigène au niveau de la membrane du globule rouge. Nous avons vu, en utilisant des antigènes marqués aux radioisotopes, qu'une partie importante de ceux-ci s'adsorbait spontanément à la surface des globules rouges, cette adsorption semble relativement forte puisque trois lavages successifs ne parviennent pas à les résorber. Il faut noter que plusieurs essais réalisés à l'aide de globules rouges frais nous donnaient des quantités d'antigène adsorbé, bien moindres. Le traitement par le formaldéhyde confère ainsi que l'ont noté de nombreux auteurs (7) (10), des propriétés particulières aux globules rouges leur permettant d'adsorber plus facilement les antigènes. Il serait intéressant, à l'aide de techniques, telle l'équilibre de dialyse, d'étudier les constantes d'association de tels systèmes, si toutefois, les liaisons impliquées sont de type électrostatique.

La répartition des antigènes à la surface des globules rouges pourrait sans doute, être définie à l'aide de techniques, telles la microscopie électronique, ou l'autoradiographie.

Le rôle du glutaraldéhyde dans la fixation des antigènes à la surface des globules est relativement complexe à imaginer. Si nous nous reportons aux chapitres étudiant l'aspect quantitatif de la fixation d'IgG marquée à l'iode 125, nous remarquons que dans les conditions standards, 8 % de l'antigène sont fixés par simple adsorption et 10 % en présence de glutaraldéhyde. Les 2 % de différence ne permettent pas d'expliquer un tel écart, il faut donc, en plus de l'aspect quantitatif envisager l'aspect qualitatif de cette fixation. Le glutaraldéhyde fixe vraisemblablement les antigènes dans une position particulière correspondant à cette augmentation de la sensibilité. En outre, d'autres expériences confirment parfaitement ceci.

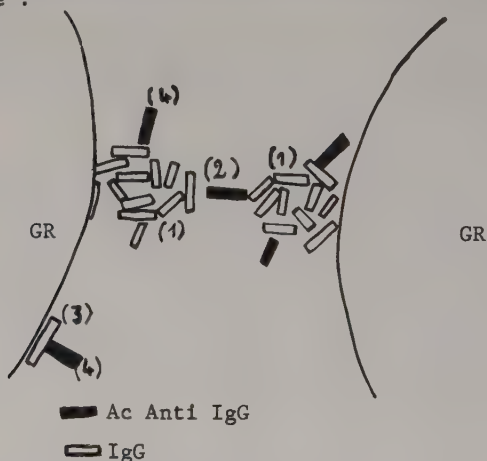
En effet, des suspensions sensibilisées en présence de glutaraldéhyde mais possédant des petites quantités d'antigène sont plus sensibles que des suspensions sensibilisées par simple adsorption et possédant des quantités d'antigène supérieures. Le rôle essentiel du glutaraldéhyde se complique encore lorsque l'on constate que la sensibilité d'une suspension sensibilisée par le glutaraldéhyde croît en même temps que la quantité d'antigène fixée. Dans la technique utilisant la B.B.D., l'augmentation de la quantité d'antigène fixée s'accompagne d'une baisse de la sensibilité, ce qui correspond logiquement à une grande consommation d'antigènes.

De telles constatations nous ont amené à formuler l'hypothèse selon laquelle, il se formerait des micro-agrégats d'IgG et de glutaraldéhyde se fixant à la surface des globules. Cette hypothèse nous a été suggérée par les travaux d'AVRAMEAS (3) sur la formation d'immuno-adsorbants à l'aide de glutaraldéhyde. Il faut noter cependant, que dans ce cas l'auteur utilise des concentrations en glutaraldéhyde beaucoup plus élevées que les nôtres et que les agrégats obtenus sont de grande taille.

Les expériences que nous avons entreprises ne nous ont pas permis d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Une étude par ultra-centrifugation, ainsi que par électrophorèse en gel d'acrylamide, nous permettrait peut-être de vérifier la présence de ces micro-agrégats.

Le deuxième problème soulevé, c'est-à-dire l'augmentation de la sensibilité des suspensions parallèlement à l'augmentation de la quantité d'antigène fixée, rejoint peut-être un fait, noté dans le travail d'AVRAMEAS (3), à propos des immuno-adsorbants. En effet, l'auteur signale que les immuno-adsorbants, réalisés, réalisés à l'aide d'IgG, ne retiennent qu'à peu près leur poids d'anticorps anti IgG, comme l'on sait que la molécule d'IgG humaine possède 8 sites antigéniques, le rendement semble faible. Parmi les explications que l'on peut donner à ce phénomène, la dissimulation des sites antigéniques à l'intérieur de l'agrégat, du fait de sa disposition stérique, en est une. Un mécanisme analogue peut être envisagé au niveau des micro-agrégats situés à la surface des globules et ne possédant que relativement peu de sites antigéniques fonctionnels. En outre, il faut admettre que la taille de l'agrégat joue le rôle le plus important dans la réalisation de ponts interglobulaires et donc dans la sensibilité.

Le schéma suivant permet en quelque sorte de résumer cette hypothèse :



- 1) - agrégat d'IgG
- 2) - anticorps fonctionnels, agglutinants
- 3) - IgG fixée par simple adsorption
- 4) - anticorps non fonctionnels.

Dans un deuxième temps, nous devons envisager les problèmes posés par le rôle de l'immunsérum utilisé pour agglutiner les globules sensibilisés. Nous avons principalement utilisé des immunsérums totaux non purifiés, sans connaître leur concentration réelle en anticorps.

Les seules études réalisées à l'aide d'anticorps purs ont eu pour but d'essayer de déterminer le rapport antigène-anticorps à la surface des globules sensibilisés ; les résultats obtenus dépendaient essentiellement des concentrations en anticorps de la solution hémagglutinante. Il serait intéressant de reprendre l'étude de certains paramètres à l'aide d'une solution d'anticorps dont la classe et la concentration soient connues. En effet, les populations d'anticorps sont relativement hétérogènes, que ce soit par leurs qualités (classe de l'immunoglobuline), ou bien, par leurs réactivités (constante d'association). Une étude de l'hémagglutination à partir de ces bases permettrait sans doute, d'approfondir les mécanismes intimes de la formation de l'agglutinat.

La troisième partie de cette discussion concerne l'inhibition de l'hémagglutination. Le problème est ici encore plus complexe, du fait de l'adjonction d'un paramètre supplémentaire correspondant au premier temps de la réaction, c'est-à-dire de l'incubation de l'antigène à doser avec plusieurs doses hémagglutinantes de l'immunsérum. Là aussi, l'immunsérum joue un rôle primordial, sa spécificité devient alors fondamentale. La purification peut être obtenue : soit par épuisement par des antigènes non spécifiques de l'immunsérum et, c'est la solution la plus facile à réaliser, soit par immunoadsorption et désorption sur l'antigène spécifique, ce qui correspond à l'obtention d'anticorps purs (3).

Les avantages que présente la technique d'inhibition sont nombreux, nous citerons en premier lieu, la possibilité de détecter et de doser les antigènes ne possédant qu'un seul déterminant. En outre, mais c'est le propre de toute technique immunologique, la spécificité de la technique est très stricte. Autre avantage particulièrement intéressant, la grande sensibilité de la méthode. Nous avons vu, en effet, qu'elle permet de doser des fractions protéiques en très faible quantité à partir d'échantillons très petits. Enfin, il faut noter la facilité de mise en oeuvre, ainsi que la rapidité de l'obtention des résultats. Son inconvénient majeur réside dans la relative imprécision des données quantitatives. Nos travaux nous ont montré qu'il semblait difficile, en pratique courante, de rendre un résultat avec une marge d'erreur inférieure à ± 50 %. Sur ce point, nous ne sommes pas en accord avec JOHANSON (21), pour qui la marge d'erreur est d'environ 20 %.

CONCLUSION. :

Après une première partie réservée à la description du matériel et des méthodes utilisés, nous comparons trois techniques d'hémagglutination passive utilisant la benzidine-bis-diazotée, le chlorure de chrome et le glutaraldéhyde. Dans les conditions où la sensibilité est maximale, la technique au glutaraldéhyde décèle des quantités d'anticorps 4 à 16 fois moindres que celles à la Benzidine-bis-diazotée et au chlorure de chrome.

Une étude des différents paramètres intervenant dans la fixation au glutaraldéhyde nous a permis de préciser que :

- La quantité d'antigène nécessaire à la sensibilisation est d'autant plus faible que l'on opère avec un volume final plus petit.
- Le temps et la température d'incubation ne modifient que peu la sensibilité des suspensions obtenues.
- En présence de l'IgG, la quantité d'antigène fixée par le globule est fonction de la quantité de glutaraldéhyde utilisée et la sensibilité des réactions est considérablement accrue, les globules formolés ayant fixé en présence de glutaraldéhyde un petit nombre de molécules d'antigène sont agglutinés à un taux toujours plus élevé que ceux ayant fixé spontanément, soit plus, soit moins de molécules d'antigène.

La deuxième partie du travail se rapporte à l'inhibition de l'hémagglutination et à ses applications.

- L'étude des différents paramètres expérimentaux nous a permis de mettre au point une technique bien standardisée. Nous l'avons appliquée au dosage des immunoglobulines dans 33 cas de dysglobulinémie et dans différents liquides biologiques.
- Les résultats obtenus en comparaison de ceux donnés par la méthode de diffusion radiale permettant de dire que cette technique, malgré son aspect semi-quantitatif, possède une sensibilité et une facilité de mise en oeuvre particulièrement intéressante.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AVRAMEAS. S., TAUDOU. B. et CHUILON. S. -1969-
Glutaraldéhyde, cyanuric chloride and tetraozotized O - Dianisidine and coupling reagents in the passive homogglutination test.
Immunochemistry 6, 67.

- 2 - AVRAMEAS. S., et TERNYNCK. Th. (1969)
The cross linking of proteins with glutaraldéhyde and its use for the preparation of immunoadsorbants.
Immunochemistry 6, 53.

- 3 - AVRAMEAS. S., TERNYNCK. Th et GUIBERT. B. (1969)
Préparations de dérivés insolubles de protéines et leur utilisation pour l'isolement d'anticorps, d'antigènes, d'enzymes et d'inhibiteurs d'enzymes.
C. R. Acad. Sciences Paris 268, 227.

- 4 - BING. D.M., WEYAND. J. G. M. et STAVISKY A.D. (1967)
Hemagglutination with aldéhyde fixed erythrocytes for essay of antigens and antibodies.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 124, 1166.

- 5 - BOYDEN. S.V. (1951)
The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid, and subsequent hemagglutination with antiprotein sera.
J. exp. med. 93, 107.

- 6 - BURNET. T.M. (1946)
Modification of human red cells by virus action II and III.
Brit. J. exp. Path. 27, 236, 244.

- 7 - BUTLER. W. T. (1963)
Hemagglutination studies with formolinized erythrocytes. Effect of B.D.B. tannic acid treatment on sensibilisation by soluble antigen.
J. Immunol. 90, 663.

- 8 - CROWLE. A. J. (1961)
Immunodiffusion.
New-York and London Academic Press. Inc.

- 9 - COOMBS. R.R.A. and Fiset M.L. (1954)
Detection of complete and incomplete antibodies to egg albumin by means of a streep red cell-agg albumin antigen unit.
Brit. J. exp. Path. 35, 472.
- 10 - CSIZMAS. L. (1960)
Preparation of formalinized erythrocytes.
Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 103, 157.
- 11 - CUA-LIM. F., RICHTER. M. et ROSE. D. (1963)
The reversed B. D. B. technics. The agglutination of antibody coated red cells by homologous antigen.
J. Allergy. 34, 142.
- 12 - FAHEY. J. L. et LAWRENCE. M. E. (1963)
Quantitative determination of 6,6 S gamma globulins, beta 2 A globulins and gamma, macroglobulins in human serum.
J. Immund. 91, 597.
- 13 - FELGENHAUER. K. (1968)
Immunological technics following microelectrophoresis on polyacrylamide gel.
Biochim. Biophys. Acta. 160, 267.
- 14 - FOLIN. O. et CIOCALTEU. V. (1927)
J. Biol. chem. 73, 627.
- 15 - FUDENBERG. H. H., DREWS. G., et NISONOFF. A. (1964)
Serologic demonstration of dual specificity of rabbit bivalent hydrid antibody.
J. exp. med. 119, 151.
- 16 - GRABAR. P. et BURTIN. P. (1964)
Immuno-electrophoretic Analysis.
Amsterdam, London, New-York, Elsevier Publishing Company.
- 17 - GRADAR. P. et WILLIAMS. C. A. (1953)
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta. 10, 193.

- 18 - GOLD. E. R., et FUDENBERG. H. H. (1967)
Chromic chloride : a coupling reagent for passive hemagglutination reactions.
J. of Immunol. 99, 5, 859
- 19 - INGRAHAN. J. S. (1958)
The preparation and use of formalinized erythrocytes with attached antigens or haptens to titrate antibodies.
Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 99, 452
- 20 - JANDL. J. H. et SIMMONS. R. L. (1957)
The hemagglutination and sensitization of red cells by metallic cations : interactions between multivalent metals and the red cell membrane.
Brit. J. Hemat. 3, 19
- 21 - JOHANSSON. S. G. O., HOGMAN. C. F. et KILLANDER. S. (1968)
Quantitative immunoglobulin determination. Comparison of two methods estimation of normal levels and levels in persons lacking IgA and IgD.
Acta path. microbiol. scandinav. 74, 519
- 22 - JOHNSON. H. N., BRENNER. K. and HALL. H. E. (1966)
The use of a water soluble carbodiimide as a coupling reagent in the passive hemagglutination test.
J. Immunol. 97, 791, 796
- 23 - JOHNSON. H. M., SMITH. B. C. et HALL. H. E. (1968)
Carbodiimide hemagglutination. A study of some of the variables of the coupling reaction.
Int. Arch. Allergy. 33, 511 - 520
- 24 - JONIAU. M., ONKELINX. E. et LONTIE. R. (1968)
Glutaraldehyde polymerized proteins as immunoadsorbants.
Arch. Int. Physiol. Biochim. 76, 128
- 25 - KRITZMAN. J. J. (1958)
Studies of rheumatoid serum employing modified coombs slide test.
Lab. Clin. Med. 53, 328
- 26 - LING. N. R. (1961)
The coupling of protein antigens to erythrocytes with difluorodinitrobenzene.
Immunology. 4, 49

- 27 - LING. N. R. (1961)
The attachment of proteins to aldehyde tanned cells.
Britt. J. Haemat. 7, 299
- 28 - LOWRY, O. H., ROSENBROUGH. N. J., FARR. A. L. et RANDALL. R. J. (1951)
Protein-measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265.
- 29 - MAC FARLANE. A. S. (1958)
Efficient trace labelling of proteins with iodine.
Nature. Lond. 182, 53
- 30 - MAC KELVEY. E. et FAHEY. J. L. (1965)
Immunoglobulin changes in disease : quantitation on the basis of Heavy polypeptide chains, IgG, IgA and IgM, and of light polypeptide chains, type K and type L.
Journal of Clin. Invest. 44, 11, 1778
- 31 - MAC KENHA. J. (1957)
A stable preparation of antigen sensitized erythrocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 95, 951
- 32 - MANCINI. G., CARBONARA. A. O. et HEREMANS. J. F. (1965)
Immunochemical quantitation of antigens by single radical immunodiffusion.
Immunochemistry. 2, 235
- 33 - MANCINI. G., VAERMAN. J.P., CARBONARA. A. O. et HEREMANS. J. F. (1964)
A single radical diffusion method for the immunological quantitation of proteins.
Prot. Biol. Fluids. 11th Collsq. Bruges : 370. 373 Ed. PEETERS.H
- 34 - MIDDLE BROOK. G. et DUBOS. R. J. (1948)
Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercule bacilli.
J. exp. Med. 88, 521
- 35 - NETER. E. (1956)
Bacterial hemagglutination and hemolysis.
Bact. Rev. 20, 166

- 36 - ONKELINX. E., MEULDERMANS. W., JONIAU. M. et LONTIE. R. (1969)
Glutaraldéhyde as a coupling reagent in passive hemagglutination
Immunology. 16, 35.
- 37 - OUCHTERLONY. O. (1948)
In vitro method for testing the toxic-producing capacity of
diphtheria bacteria.
Acta. path. microbiol. scand. 25, 186
- 38 - OUDIN. J. (1946)
Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique
en milieu gélifié.
C. R. Acad. Sci. 222, 115
- 39 - PRESSMAN. D., CAMPBELL. D. H., et PAULING. L. (1942)
The agglutination of intact azo-erythrocytes by antiserum
homologous to the attached group.
J. Immunol. 84, 485
- 40 - PUTTNAM. F. W. et STELOS. P. (1953)
Proteins in multiple myeloma II. Bence Jones proteins.
J. Biol. chem. 203, 347
- 41 - RAYMOND. S., et WEINTRAUB. L. (1959)
Science 130, 711
- 42 - SCHEIDEGGER. J. J. (1955)
Une micro méthode de l'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy. 7, 103
- 43 - SEGRE. D. (1962)
Detection of hog cholera virus by a hemagglutination test.
Amer. J. vet. Res. 23, 748.
- 44 - SMIT. G. L. (1964)
The use of formalin : preserved human erythrocytes in the toxo-
plasma hemagglutination test.
Trop. geogr. Med. 16, 152

- 45 - STAVISKY. A. B. et ARQUILLA. E. R. (1955)
Procedure on applications of hemagglutination and haemagglutination inhibition reactions with B.D.B. and protein-conjugated red blood cells.
J. Immunol. 74, 306
- 46 - TOI. K., SALVATORE. G. and CAHNMANN. H.J. (1965)
Biochim. Biophys. Acta. 97, 523
- 47 - TSUMITA. T. et OHASHI. M. (1964)
A synthetic acylpolysaccharide and the hemagglutination activity.
J. exp. Med. 119, 1017
- 48 - URIEL. J. (1966)
Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide agarose.
Bull. Soc. chim. biol. 48 n° 8 - 9, 969
- 49 - URIEL. J. et BERGES. J. (1966)
C. R. Acad. Sc. Paris. 1966, 262, 164
- 50 - VERGANI. G., STABILINI. R., et AGOSTINI. A. (1967)
Quantitative determination of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion on cellulose acetate.
Immunochemistry. 4, 233
- 51 - WEINBACH. R. (1958)
Die verwendbarkeit formolbehandelter erythrocyten als Antigen-träger in der indirekten haemagglutination.
Schweiz. Z. Path. 21, 1043
- 52 - ZAPPACOSTA. S. et ROSSI. G. (1967)
An improved method for radiodination of γ G immunoglobulin.
Immunochemistry. 4, 122
- 53 - SANDOR. G., ORLEY. C., KRAUS. W., et KORACH. S. (1967)
Immunsérums correspondant à des composants protéidiques individuels du Sérum humain. Leur application à l'immunochimie quantitative par la méthode de diffusion radiale.
Résultats obtenus chez le sujet normal.
Ann. Inst. Pasteur. 117, 6, 747.

P L A N

INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	3
MATERIEL ET METHODES	5
- Formolisation des hématies	6
- Méthode d'immunisation	10
- Méthode de fractionnement des protéines :	
Immunoglobulines G	13
Protéines de Bence Jones	16
Immunoglobulines M	18
- Méthode de concentration des solutions protéiques	20
- Dosage des Protéines	23
- Dosage des antigènes et des anticorps	27
- Critères de pureté	31
- Technique de marquage des protéines	36
- Préparation de la Benzidine-bis-diazotée	38
- Préparation d'anticorps purs	39
ETUDE DE L'HEMAGGLUTINATION PASSIVE	41
Etude comparative des trois techniques de sensibilisation	42
I - Introduction.	42
II - Méthode utilisant la B.B.D.	46
Principe	
Technique	
Etude des principaux paramètres	
Conclusion	
III - Méthode utilisant le Cl 3 Cr	48
Principe	
Technique	
Etude des principaux paramètres	
Conclusion	

IV	- Méthode utilisant le glutaraldéhyde	50
	Principe	
	Technique	
	Etude des principaux paramètres	
	Conclusion	
V	- Etude quantitative de la fixation d'antigènes marqués aux radioisotopes	52
	Comparaison des trois techniques :	
	Principe	
	Tableaux comparatifs	
	Conclusion	
VI	- Etude complémentaire des différents paramètres inter- venant dans la technique au glutaraldéhyde	55
	1) - Influence de différents facteurs sur la sensibi- lité des suspensions globulaires	57
	2) - Influence de la concentration globulaire au mo- ment de la sensibilisation	58
	3) - Influence de la concentration en glutaraldéhyde et en IgG sur la quantité d'IgG fixée	60
	4) - Rôle du temps d'incubation	61
	5) - Rôle de la température d'incubation	62
	6) - Rôle du pH	63
	7) - Analyse des eaux de lavage du culot globulaire	64
	8) - Sensibilisation successive sur un même lot de globules	68
	9) - Fixation d'antigènes différents	70
	10) - Fixation simultanée de plusieurs antigènes	78
	11) - Sensibilité limite pour la détection d'anticorps	85
VII	- Essais d'explication du phénomène de fixation	86
	1) - Hypothèse	86
	2) - Fixation d'agrégats formés par le glutaraldéhyde.	88
	3) - Fixation d'agrégats formés par l'action de la chaleur	89
	Etude de l'inhibition de l'hémagglutination	91

I	- Etude des différents paramètres intervenant dans la technique d'inhibition de l'héماغglutination	91
	1) - Description de la technique standard	91
	2) - Rôle du volume des différentes solutions utilisées	92
	3) - Rôle de la concentration de l'immunserum	92
	4) - Rôle du temps d'incubation	93
	5) - Influence de la sensibilisation des globules	93
	6) - Inhibition réalisée à l'aide de globules sensibilisés par plusieurs antigènes	95
	7) - Etude comparée des résultats d'inhibition obtenus avec des lots de globules sensibilisés par la B.B.D., le chlorure de chrome et le glutaraldéhyde	98
	8) - Précision de la méthode	100
	9) - Sensibilité de la méthode dans la détection d'antigène	101
	10) - Influence des protéines non spécifiques	101
	11) - Protocole opératoire de la réaction d'inhibition	102
II	- Application de la technique d'inhibition de l'héماغglutination au dosage des immunoglobulines	104
	1) - Dosages comparatifs d'immunoglobulines par diffusion radiale et par inhibition de l'héماغglutination de 33 cas de dysglobulinémies	104
	2) - Dosage par inhibition de l'héماغglutination d'immunoglobulines dans différents liquides biologiques	108
	A - Dans le liquide céphalo-rachidien ...	108
	B - Dans l'urine normale	108
	C - Dans la salive	109
	D - Dans le colostrum	110
	E - Dans le liquide séminal	110
	DISCUSSION	111
	CONCLUSION	114
	BIBLIOGRAPHIE	115

